

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Tereza Dolejšová

**Vlastnosti membránových pórů tvořených nově objeveným  
kolicinem F<sub>Y</sub> bakterie *Yersinia frederiksenii***

Characterization of membrane pores formed by newly discovered colicin F<sub>Y</sub>  
from *Yersinia frederiksenii*

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Školitel: Radovan Fišer, Ph.D

Praha 2012

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 14. 05. 2012

Tereza Dolejšová

## **Poděkování**

Tímto bych chtěla poděkovat především svému školiteli Radovanu Fišerovi, Ph.D, za cenné rady a pomoc při psaní této práce a také všem ostatním členům Laboratoře fyziologie bakterií na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy za milé přijetí a pomoc při mé experimentální práci. V neposlední řadě také své rodině za všestrannou podporu.

## Obsah

Obsah.....	4
Abstrakt.....	5
1. Úvod.....	6
2. Koliciny obecně.....	7
2.1. Obecný mechanismus překonání vnější membrány.....	7
2.1.1. Koliciny skupiny A.....	8
2.1.2. Koliciny skupiny B.....	9
2.2. Typy kolicinů.....	9
2.2.1. Kolicin A.....	9
2.2.2. Kolicin B.....	11
2.2.3. Kolicin D.....	12
2.2.4. Kolicin E1.....	13
2.2.5. Koliciny E2 – 9.....	14
2.2.5.1. Koliciny E2, E7, E8 a E9.....	14
2.2.5.2. Koliciny E3, E4, E6.....	15
2.2.5.3. Kolicin E5.....	15
2.2.6. Kolicin Ia.....	16
2.2.7. Kolicin Ib.....	18
2.2.8. Kolicin Js.....	18
2.2.9. Kolicin K.....	18
2.2.10. Kolicin M.....	19
2.2.11. Kolicin N.....	20
2.2.12. Kolicin S4.....	21
2.2.13. Kolicin U.....	22
2.3. Pórotvorné koliciny.....	22
2.3.1. Struktura pórů.....	22
2.3.2. Elongace $\alpha$ -helixů.....	24
2.3.3. Zabudovávání do membrány.....	24
2.3.4. Lipidy interagující s koliciny.....	25
2.3.4.1. Inzerce C-terminální domény do lipidové dvojvrstvy.....	25
2.3.4.2. Interakce kolicinů s lipidovou dvojvrstvou.....	25
2.3.4.3. Toroidální model póru.....	25
3. Kolicin F <sub>Y</sub> .....	26
3.1. <i>Yersinia Frederiksenii</i> .....	27
3.2. Experimentální část.....	27
3.2.1. Cíl práce.....	27
3.2.2. Metody.....	27
3.2.3. Výsledky a diskuze.....	28
3.2.3.1. Závislost aktivity kolicinu na Ca <sup>2+</sup> .....	28
3.2.3.2. Vodivost jednotlivých kanálů kolicinu F <sub>Y</sub> .....	29
3.3. Shrnutí.....	31
4. Závěr.....	32
5. Seznam použité literatury.....	34

## Abstrakt

Koliciny jsou toxické extracelulární proteiny, které se uplatňují v mezidruhové i intradruhové konkurenci bakterií. Nově objevený kolicin F<sub>Y</sub> je pórotvorný protein, objevený na Masarykově univerzitě. Je produkován kmenem bakterie *Yersinia frederiksenii* Y27601. Byla prokázána aktivita kolicinu F<sub>Y</sub> proti rodu *Yersinia*. Porovnáním aminokyselinových sekvencí C-terminálních domén různých kolicinů bylo dokázáno, že kolicin F<sub>Y</sub> je blízce příbuzný kolicinu Ib (Bosák et al., 2012). V této práci jsem se snažila vytvořit stručný a ucelený přehled o skupině kolicinů z pohledu mechanismu jejich translokace přes vnější membránu, následně přes periplazmatický prostor až k inzerci C-terminální domény kolicinu do fosfolipidové dvojvrstvy vnitřní membrány. Dalším cílem bylo obecně shrnout vlastnosti membránových pórů již prozkoumaných kolicinů a porovnat je s čerstvě naměřenými charakteristikami kolicinu F<sub>Y</sub>.

**Klíčová slova:** kolicin, *Yersinia*, planární lipidové membrány, membránový pór

## Abstract

Colicins are toxic exocellular proteins used by Gram-negative bacteria for interspecies and intraspecies competition. The colicin F<sub>Y</sub> is a pore-forming protein which was recently discovered at Masaryk university. Colicin F<sub>Y</sub> is produced by strain *Yersinia frederiksenii* Y27601 and is active against other strains of genus *Yersinia*. By comparison of aminoacid sequences of C-terminal domains of selected colicins it was proved, that colicin F<sub>Y</sub> is closely related to colicin Ib (Bosák et al., 2012). In this work I was trying to create brief and integrated summary about the group of colicins from the perspective of an outer membrane traslocation mechanism, overcoming the periplasmic space up to isertion of C-terminal colicin domain into the inner membrane phospholipid bilayer. Other aim of my work was to generally summarize pore properties of known colicins and compare them with recently measured characteristics of colicin F<sub>Y</sub>.

**Keywords:** colicin, *Yersinia*, planar lipid membranes, membrane pore

## 1. Úvod

Koliciny jsou extracelulární toxiny proteinové povahy produkované bakterií *Escherichia coli* nebo některými dalšími příbuznými gramnegativními bakteriemi z rodiny (čeledi) *Enterobacteriaceae*, jako jsou například *Shigella sonnei* (kolicin Js), *Citrobacter freundii* (kolicin A), či *Yersinia frederiksenii* (kolicin F<sub>Y</sub>) a další (Smarda and Smajs, 1998; Šmajs and Weinstock, 2001; Varenne et al., 2005; Bosák et al., 2012). Koliciny, které jsou součástí velké skupiny bakteriocinů, byly objeveny roku 1925 (Gratia, 2000) André Gratiou, přičemž historicky prvním objeveným bakteriocinem byl kolicin V, dnes už klasifikovaný jako člen skupiny mikrocinů (Yang and Konisky, 1984). Mikrocinů bývají menší a také u nich narozdíl od kolicinů dochází k posttranslačním modifikacím (Duquesne et al., 2007).

Koliciny mají antimikrobiální aktivitu. Účinkují jen na blízké příbuzné produkčního kmene a zabíjí je pomocí jednoho ze speciálních mechanismů: tvorbou membránových pórů, nukleázovou aktivitou anebo schopností degradovat meziprodukty syntézy peptidoglykanové vrstvy.

Koliciny jsou nejintenzivněji studovanými bakteriociny gramnegativních bakterií. K syntéze kolicinů dochází pouze při vysoce stresových podmínkách, nejčastěji když v buňce dochází k SOS odpovědi. Tato syntéza je regulována pomocí proteinů LexA a RecA, přičemž LexA působí jako represor a RecA jako aktivátor exprese. (Gillor et al., 2008). Konkrétní funkcí proteinu RecA je štěpení proteinu LexA, čímž brání represí syntézy kolicinů (Butala et al., 2009). Syntézu kolicinů zajišťují Col plazmidy skládající se ze tří hlavních částí, první část kóduje gen samotného kolicinu, další gen imunitního proteinu a poslední část, identifikovaná jen u některých Col plazmidů, je část kódující lytické proteiny způsobující lýzu buňky, což umožňuje kolicinům rozptýlit se do prostředí. Imunitní proteiny jsou důležitým obranným mechanismem buňky proti kolicinům, a to jak proti jí produkovaným kolicinům, tak také proti některým kolicinům přijímaným z okolí. Dále se o nich však nebudu zmiňovat, přestože je to velmi zajímavé a důležité téma pro další studium kolicinů. Lytický protein syntetizují všechny Col plazmidy ze skupiny A, stejně jako Col plazmidy prvního typu u B skupiny (kolicin 5, 10). Zatímco Col plazmidy druhého typu lytický gen neobsahují (vyjimku tvoří pouze kolicin D, který je přenášen spolu s lytickým proteinem (Cascales et al., 2007)).

Skupina kolicinů slouží jako modelový systém pro studium mechanismů bakteriocinové struktury, funkce, genetické organizace, ekologie a evoluce. Přičemž je do

současnosti sporná primární funkce vzniku kolicinů - výsledky Gillora a kolektivu (2009) naznačují, že by se koliciny mohly uplatňovat v osídlování gastrointestinálního traktu živočichů probiotyckými bakteriemi *Escherichia coli*. Průzkumy produkce kolicinů v přirozených populacích ukazují, že 10-50% z izolovaných bakterií *Escherichia coli* produkuje koliciny (Riley and Gordon, 1996; Barnes et al., 2007).

Cílem této práce je stručně shrnout mechanismus průniku do buňky u většiny známých kolicinů. Dále se zaměřit na pórtvorné koliciny, především na strukturu jejich C-terminální domény a porovnat příbuzné koliciny a jejich mechanismy s prozatím naměřenými vlastnostmi kolicinu F<sub>Y</sub>, produkovaného bakterií *Yersinia frederiksenii*. V budoucnu bych chtěla pokračovat v práci na bližší charakterizaci kolicinu F<sub>Y</sub> a nově se zaměřit i na další z pórtvorných kolicinů, kolicin U.

Dále se nebudu věnovat kolicinu L (*Serratia marcescens*), S1, Y, 5,10 (*E.coli*), kloacinu DF13(*E. Cloacae*), pesticinu I (*Yersinia pestis*), bakteriocinu 28b (*Serratia marcescens*) a některým dalším kolicinům a bakteriocinům blízké příbuzným kolicinům. A to z toho důvodu, že o většině výše zmíněných je toho prozatím zjištěno velmi málo.

## **2. Koliciny**

### **2.1. Mechanismus transportu kolicinů přes vnější membránu**

Všechny známé koliciny mají podobnou molekulární strukturu, skládají se ze tří domén: N-terminální domény, zajišťující translokaci kolicinu přes vnější membránu napadené gramnegativní buňky, centrální domény, která zprostředkovává první kontakt s vnější membránou bakterie a to vazbou na vnější receptor a nakonec z C-terminální domény, která zajišťuje vlastní aktivitu kolicinu. Všechny koliciny můžeme rozdělit na dvě skupiny podle proteinů využívaných pro translokaci na skupinu A, využívající Tol proteiny a skupinu B, využívající proteiny TonB komplexu (Lazdunski et al., 1998). Základní mechanismus přenosu je: navázání na receptor, který je primárně využíván pro transport jiných molekul, a to pomocí centrální domény (receptor-vázající doména). Následně je kolicin transportován pomocí N-terminální domény přes vnější membránu do periplazmy dodnes ne zcela známým způsobem a nakonec dochází k interakci C-terminální domény s vnitřní membránou a k vlastnímu účinku konkrétního proteinu (Cascales et al., 2007).

#### **2.1.1. Koliciny skupiny A**

K tomu, aby koliciny mohly vstoupit do buňky, využívají již existujících proteinů a

proteinových komplexů, které mají zcela jinou původní funkci. Nejdřív musí kolicin svojí centrální doménou interagovat s určitým receptorem. Mezi receptory běžně využívané koliciny skupiny A patří především BtuB receptor, jehož původní funkcí je transport vitamínu B<sub>12</sub> (Lazdunski et al., 1998).

Koliciny skupiny A používají k transportu přes vnější membránu proteiny vnější membrány (Omp-Outer membrane proteins). Omp je skupina proteinů, vyskytujících se ve vnější membráně gramnegativních bakterií. Molekuly Omp mají strukturu antiparalelního  $\beta$ -barelu, který se skládá od 8 do 22  $\beta$ -listů. Omp můžeme rozdělit na 6 typů: OmpA protein, OmpX protein, fosfolipázu A, obecné (general) poriny (OmpF, PhoE), poriny specifické pro substrát (LamB, ScrY) a TonB-dependentní sideroforové přenašeče železa FhuA a FepA. Tyto poriny mají různé funkce, především umožňují absorpci molekul (železosideroforových komplexů, maltosy, atd.) (Koebnik et al., 2000). Do skupiny A patří koliciny A, E1-E9, K, L, N, S4, U, Y, bakteriocin 28b, kloacin DF13 (Cascales et al., 2007).

Přechod periplazmou umožňuje interakce s Tol proteiny. Tol systém v gramnegativní bakterii je nezbytnou součástí systému udržujícího stabilitu vnější membrány buňky, přesto primární funkce Tol systému v buňce není zatím zcela objasněna (Lloubès et al., 2001). Celý Tol systém je tvořen pěti proteiny TolA, TolQ, TolR, TolB a proteinem Pal. Proteiny TolA, TolQ a TolR tvoří komplex, ukotvený ve vnitřní membráně buňky (Lazzaroni et al., 2002), přičemž TolQ je protein vnitřní membrány, obsahující tři transmembránové domény, TolR je také složený ze tří domén stejně jako TolA protein, který má ovšem N-terminální doménu zakotvenou ve vnitřní membráně, centrální doménu a C-terminální doménu, která směřuje do periplazmy (Journet et al., 1999). TolB protein se skládá ze dvou domén a jednou z jeho funkcí v buňce je se spolu s Pal proteinem účastnit ukotvování vnější membrány k peptidoglykanové vrstvě (Abergel et al., 1999). Protein TolB tvoří komplex s Pal proteinem, jak dokázal pokusy s využitím značených TolB proteinů Bouveret a kolektiv (1995). Komplex TolB s Pal je ukotvený ve vnější membráně a směřuje do periplazmy (Obr.1). Pal je lipoprotein zakotvený ve vnější membráně, spojený s peptidoglykanem (Bouveret et al., 1995). Spojení mezi komplexy TolAQR a TolB-Pal zajišťuje především interakce mezi proteiny TolA a Pal (Lazzaroni et al., 2002).

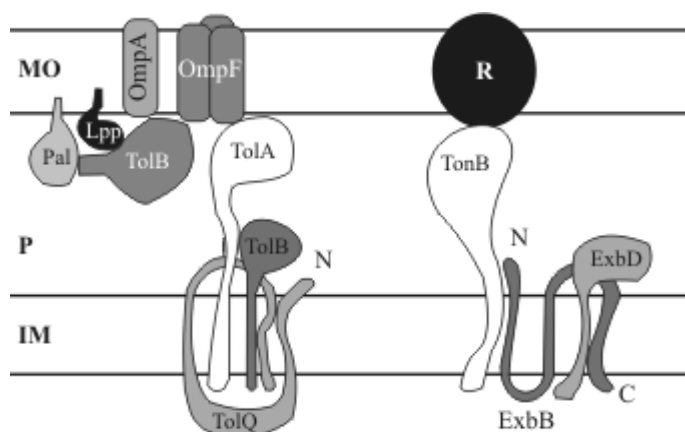
### **2.1.2. Koliciny skupiny B**

Nejdříve se koliciny skupiny B stejně jako u skupiny A navazují na receptory. Jsou to receptory různých funkcí, například železitý enterobaktinový receptor FepA, ferrichromový receptor FhuA, receptor Cir a další. Dosud není známý sekundární translokační membránový



protein (Cascales et al., 2007). Výsledky pokusů Devanathana a Postla (2007) s kolicinem B poukazují na to, že kolicin se translokuje přes vnější membránu přímo přes FepA, který nejdříve využívá jako receptor. Nevyužívá tedy žádný další protein vnější membrány (Omp).

K translokaci periplazmou dochází pomocí komplexu proteinů TonB, ExbB a ExbD. Klíčový je protein TonB, který je N-koncem zakotven v cytoplasmatické membráně, zatímco větší část zůstává volně v cytoplasmě. TonB interaguje s mnoha proteiny vnější membrány, které slouží jako receptory, a také interaguje s cytoplasmatickým proteinem ExbB pomocí transmembránových domén obou proteinů ExbB i TonB (Postle, 1993). ExbB je transmembránový protein, má tři transmembránové segmenty včleněné do vnitřní membrány a zbylou část má v cytoplasmě (Kampfenkel and Braun, 1993). ExbD protein interaguje s proteinem ExbB a tvoří tak komplex s ExbB a TonB proteiny. Je zakotvený svým N-koncem v cytoplasmatické membráně a má periplasmickou doménu volně v periplasmě (Lazdunski et al., 1998).



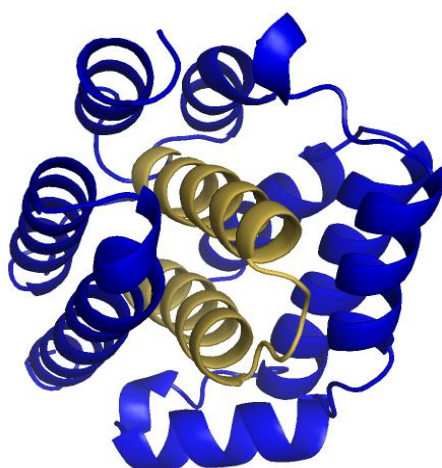
**Obr. 1: Tol-Pal a TonB translokační systém,** P. periplazmatický prostor, IM. vnitřní membrána, R. TonB-dependentní receptor, C. C-konec a N. N-konec (převzato z Cursino et al., 2002)

## 2.2. Typy kolicinů

### 2.2.1. Kolicin A

Kolicin A je pórotvorný kolicin, produkováný bakterií *Citrobacter freundii*. Skládá se ze tří domén (Obr. 2). **Centrální (receptorová) doména** se váže na receptor BtuB ( $\beta$ -barelový integrální protein vnější membrány s 22 antiparalelními-beta listy, jeho původní funkcí je transport kobalaminu přes vnější membránu (Sharma et al., 2007)). **N-terminální (translokační) doména** kolicinu A interaguje s TolABQR komplexem (komplex proteinů TolA, TolB, TolQ a TolR, který je navázaný v cytoplasmatické membráně a vyčnívá směrem

do cytoplazmy) a OmpF proteinem (protein zanořený ve vnější membráně tvořící trimery, přičemž každý monomer je se skládá z 16ti-listového  $\beta$ -barelu (Alcaraz et al., 2004)). N-terminální doména kolicinu tak zajišťuje translokaci přes vnější buněčnou membránu do periplazmatického prostoru a C-terminální doména vytváří póry v cytoplazmatické membráně (Martinez et al. 1983) citováno podle (Ibañez De Opakua et al., 2010). **C-terminální doména** nejdříve interaguje s negativně nabitými fosfolipidy a následně vytváří pór. Tato doména se skládá z 10  $\alpha$ -helixů. Helixy 8 a 9 vytváří vlásenku, která je zanořena do membrány a obsahuje pouze hydrofobní a neutrální zbytky, tato vlásenka tedy může mít funkci kotvy. Existují dva modely polohy inzertované domény, „umbrella“ (deštníkový) model, kde je vlásenka z 8. a 9.  $\alpha$ -helixu zanořena napříč cytoplazmatickou membránou, přičemž  $\alpha$ -helixy 1 a 2 jsou natočené v opačném směru než  $\alpha$ -helixy 4-7. Další je model „penknife“ (kapesního nože), ve kterém je doména umístěna paralelně s povrchem membrány. Kolicin A zřejmě odpovídá modelu „penknife“. V tomto případě tedy vlásenka nemá funkci kotvy (Duche et al., 1994).

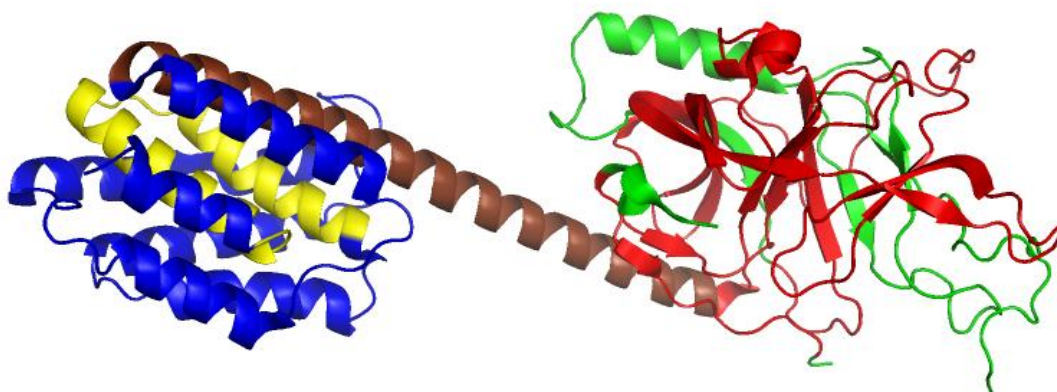


**Obr. 2 :** Krystalová struktura C-terminální domény kolicinu A (aminokyselinové zbytky: 392–592), hydrofobní vlásenka – žlutá, ostatní  $\alpha$ -helixy - modré. Ilustrace struktur byly vytvořeny v programu Pymol. Struktura PDB (Protein Data Bank): 1COL.

### 2.2.2. Kolicin B

Pórotvorný kolicin, který je produkován bakterií *Escherichia coli*, je složený ze tří domén. Struktura kolicinu B (Obr3) má činkovitý tvar a to díky dlouhému  $\alpha$ -helixu (74 Å), který propojuje C-terminální doménu s komplexem N-terminální a centrální domény. Podobný  $\alpha$ -helix mají i koliciny Ia (Wiener et al., 1997) a N (Vetter et al., 1998).

**N-terminální a centrální doména** nejsou jasně vymezeny. Místo toho má kolicin B N-terminální lalok, obsahující obě tyto domény, skládá se ze 17  $\beta$ -listů, 2  $\alpha$ -helixů a dlouhé smyčky mezi nimi (Hilsenbeck et al., 2004). Váže se na receptor FepA (Ferric enterobactin protein). Je to porinový protein, zanořený ve vnější membráně, který se běžně účastní aktivního transportu sideroforů (proteinů vázajících železné ionty) z extracelulárního prostoru do periplazmy u gramnegativních bakterií. Konkrétně obstarává přenos železitého enterobaktinu do periplasmy. Protein FepA se skládá ze dvou domén, první je  $\beta$ -barel složený z 22 antiparalelních listů a druhá je N-terminální globulární doména složená ze dvou dlouhých ohybů, několika krátkých  $\beta$ -listů a 1 obráceného helixu (Krewulak and Vogel, 2008), pomocí interakce s komplexy proteinů TonB, ExbB, ExbD zajišťuje FepA translokaci kolicinu B. **C-terminální doména** kolicinu B se skládá z 10  $\alpha$ -helixů. Z toho dva hydrofobní helixy 8 a 9 tvoří vlásenku. Při formování kanálu hraje zřejmě důležitou roli rozkládání této vlásenky, což je zprostředkováno formací částečně rozbaleného stavu (molten globule) a podporováno acidickým povrchem vnitřní bakteriální membrány (Hilsenbeck et al., 2004).

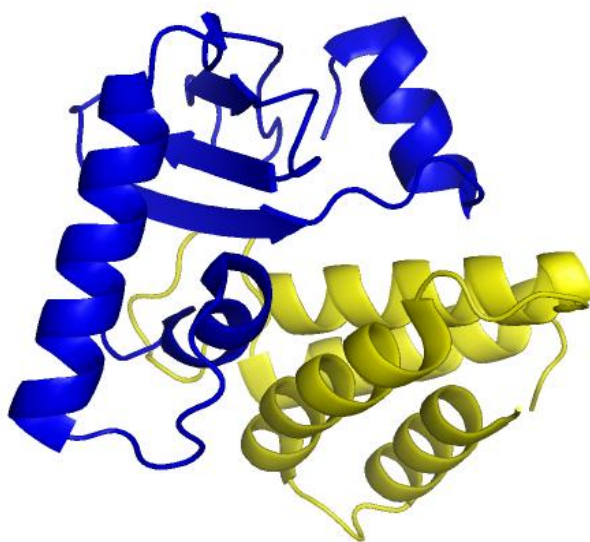


**Obr. 3:** Krystalová struktura kolicinu B (10-511), N-terminální doména – zelená, centrální doména – červená, C-terminální doména – modrá, hydrofobní vlásenka – žlutá, dlouhý  $\alpha$ -helix propojující N-terminální a C-terminální doménu - hnědý. Struktura PDB: 1RH1.

### 2.2.3. Kolicin D

Kolicin D (Obr.4), produkovaný bakterií *Escherichia coli*, má tRNázovou aktivitu, při které C-terminální doména kolicinu specificky štěpí tRNA a to především tRNA<sup>Arg</sup>. Cílem jsou konkrétně 4 typy tRNA s antikodony ICG,CCG, U\*CU(U\* = 5-methylaminomethyluridine) a CCU(kodují arginin). Štěpení tRNA probíhá na pozicích 38(A) a 39(C nebo G) (Yajima et al., 2004).

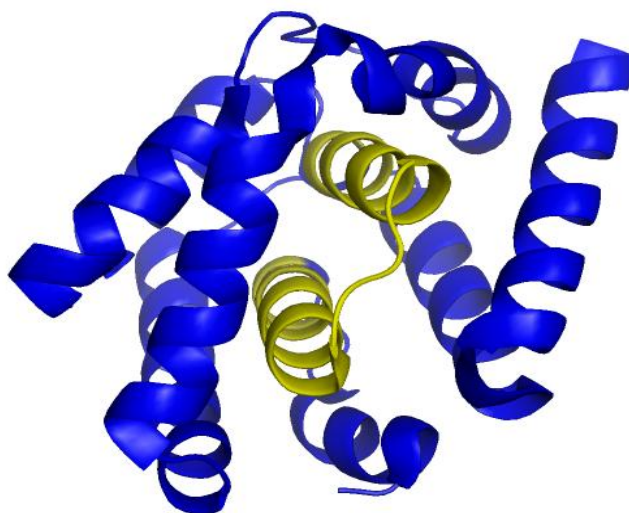
**N-terminální doména** je z 96% shodná s N-terminální doménou kolicinu B (Roos et al., 1989), takže závisí na stejném receptoru FepA a na stejném translokačním komplexu proteinů TonB, ExbB a ExbD. **Centrální doména** má dvojí funkci, interaguje s TonB a přispívá k formaci imunitního komplexu s imunitním proteinem (ten interaguje jak s C-terminální doménou tak i s tou centrální a to pomocí čtvrtého  $\alpha$ -helixu). **C-terminální doména** je tvořena čtyřmi antiparalelními beta-listy, dvěma  $\alpha$ -helixy na jedné straně a jedním kratším  $\alpha$ -helixem na straně druhé. Je schopná tvořit komplex s imunitním proteinem, který je složen ze 4  $\alpha$ -helixů postavených paralelně vedle sebe. Tento komplex vzniká na základě elektrostatických interakcí, pozitivního náboje na C-terminální doméně a negativního na imunitním proteinu (tRNA má též negativní náboj) (Yajima et al., 2004).



**Obr. 4:** Krystalová struktura C-terminální domény kolicinu D (604-697) s imunitním proteinem, C-terminální doména – modrá, imunitní protein – žlutý. Struktura PDB: 1TFK.

#### 2.2.4. Kolicin E1

Kolicin E1 (Obr.5) je pórtvorný kolicin syntetizovaný bakterií *Escherichia coli*. Jeho **N-terminální a centrální domény** zajišťují transport kolicinu přes vnější membránu a periplazmatický prostor a to na základě dvoureceptorového komplexu, pomocí dvou membránových proteinů (BtuB a TolC). **Centrální doména** má vazebné místo pro BtuB a **N-terminální doména** pro TolC protein (vytváří  $\beta$ -barel), který zajišťuje samotnou translokaci přes vnější membránu (Zakharov et al., 2004a). Dále je translokace vedena dalším proteinem TolA, ale ještě není přesně známo jakým způsobem. **C-terminální doména** má  $\alpha$ -helixy příliš krátké na to, aby prostoupily membránou. Skládá se z 10  $\alpha$ -helixů, z toho dva nejdelší (8. a 9.  $\alpha$ -helix) tvoří hydrofobní vlásenku v apolárním jádře kanálové domény, přičemž má tato vlásenka zřejmě funkci membránové kotvy. Po počáteční interakci proteinu s vnitřní membránou následně musí tato doména podstoupit mnoho konformačních změn, aby se do této membrány správně včlenila (Zakharov and Cramer, 2002).



**Obr. 5:** Krystalová struktura C-terminální domény kolicinu E1(370-522), hydrofobní vlásenka – žlutá, ostatní  $\alpha$ -helixy - modré. Struktura PDB: 2I88.

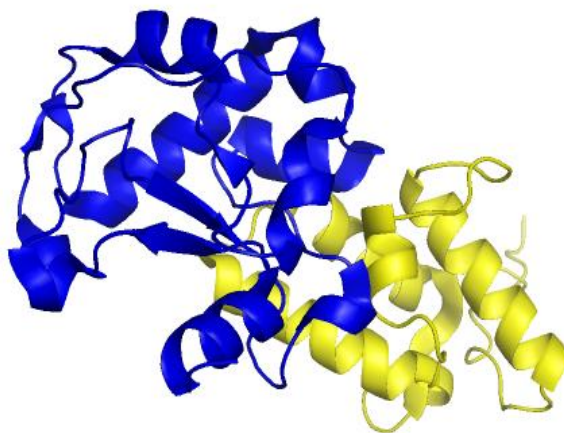
### 2.2.5. Koliciny E2-E9

Koliciny E – můžeme rozdělit do čtyř skupin podle jejich aktivity: kolicin E1 je pórůtvorný, koliciny E2, E7, E8 a E9 mají DNázovou aktivitu, kolicin E5 má tRNázovou aktivitu a koliciny E3, E4 a E6 mají ribonukleázovou aktivitu. Všechny koliciny E, kromě kolicinu E1, který je probírán výše, mají podobný mechanismus přechodu přes vnější membránu a využívají k tomu dokonce i stejné receptory.

Všechny enzymatické koliciny E mají minimální **centrální doménu**, která je identická pro koliciny E2, E3, E6, E7, E8 a E9. Tato doména interaguje s receptorem BtuB (22-listový  $\beta$ -barel, který je kompletně uzavřený zátkovou (plug) doménou, přičemž se soudí, že kolicin komunikuje s periplasmou pomocí různě změněné konformace této zátkové domény) (James et al., 2002). Koliciny E jsou traslokovány přes porin OmpF a to díky interakci s **N-terminální doménou** a následné interakci s komplexem proteinů TolA, TolB, TolQ, TolR (Sharma et al., 2007).

#### 2.2.5.1. Koliciny E2, E7, E8 a E9

Všechny čtyři koliciny mají cytotoxickou doménu sekvenčně homologní až z 65%. **C-terminální doména** (Obr.6) nespecificky štěpí chromozomální DNA s jistou preferencí pro thyminové báze, čímž způsobuje degradaci DNA, má však slabou aktivitu i na RNA. Obsahuje aktivní místo, nazývané H-N-H motív (pojmenované podle stálých aminokyselin v tomto motivu), které váže různé ionty kovu především ionty  $Mg^{2+}$ , na nichž je aktivita tohoto kolicinu závislá. Toto aktivní místo obsahuje více než 30 zbytků aminokyselin a je univerzálním strukturním prvkem u prokaryot i eukaryot. (James et al., 2002).

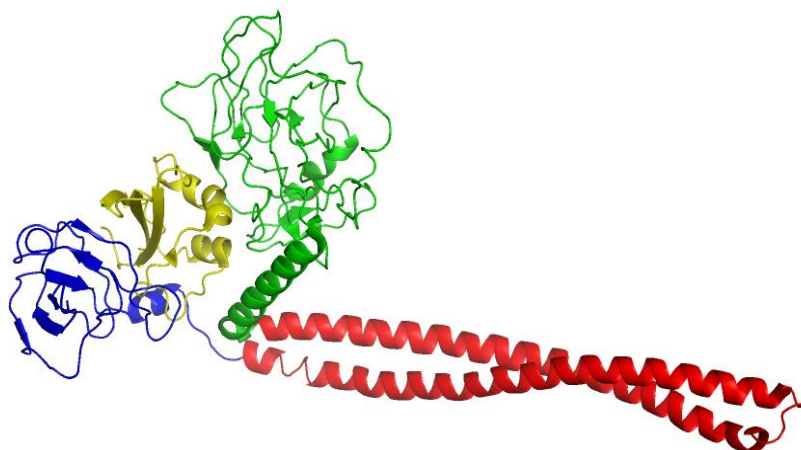


**Obr. 6:** Krystalová struktura C-terminální domény kolicinu E2 s imunitním proteinem, C-terminální doména – modrá, imunitní protein – žlutý. Struktura PDB: 3U43.



### 2.2.5.2. Koliciny E3, E4, E6

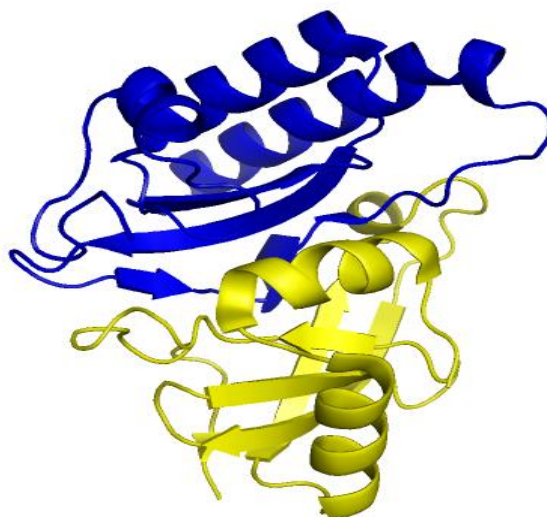
**N-terminální i centrální doména** (Obr.7) odpovídají doménám předešlých kolicinů E. **C-terminální doména** štěpí fosfodiesterovou vazbu v dekódující oblasti 30S podjednotky ribozomu, váže se na 70S podjednotku a hydrolyzuje 16S ribosomální RNA (rRNA) mezi Ala-1493 a Gly-1494, čímž zastavuje proteosyntézu (Ng et al., 2010) (viz obr.7).



**Obr. 7:** Krystalová struktura kolicinu E3 (84-551) s imunitním proteinem, N-terminální doména – zelená, centrální doména – červená, C-terminální doména – modrá, imunitní protein – žlutý. Struktura PDB: 1JCH.

### 2.2.5.3. Kolicin E5

Kolicin E5 (Obr.8) je transportován přes vnější membránu stejným mechanismem a pomocí stejných receptorů jako u ostatních kolicinů E. Liší se od ostatních svou cytotoxickou doménou, která má zcela jinou funkci než ostatní (viz obr.8). Jak zjistili Ogawa a kolektiv (1999) C-terminální doména štěpí ty jednotky tRNA, které obsahují hypermodifikovanou bázi queueine(Q), která je specifická pro tRNA nesoucí aminokyseliny Asn, Asp, His, a Tyr.



**Obr. 8:** Krystalová struktura C-terminální domény kolicinu E5 s imunitním proteinem, C-terminální doména – modrá, imunitní protein – žlutý. Struktura PDB: 2DFX.

### 2.2.6. Kolicin Ia

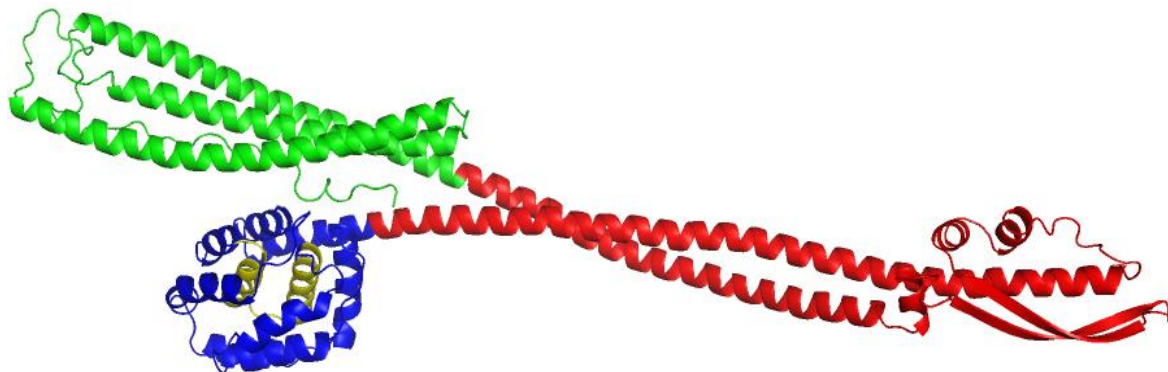
Vzhledem k vysoké příbuznosti kolicinu F<sub>Y</sub> zjištěné ke kolicinu Ib i Ia, se jimi budu zabývat poněkud podrobněji. Kolicin Ia je produkován bakterií *Escherichia coli*, je pórotvorný a těsně příbuzný kolicinu Ib. **Centrální doména** kolicinu Ia se váže na receptor vnější membrány Cir. Podobně jako ostatní Omp se protein Cir skládá 22-listového transmembránového  $\beta$ -barelu, který má ovšem uvnitř  $\beta$ -barelu zátkovou doménu (Ferguson and Deisenhofer, 2004), obsahující na svém N-konci TonB box). Přes TonB box na zátkové doméně proteinu Cir dochází k interakci s komplexem proteinů TonB, ExbB a ExbD, který zajišťuje přechod kolicinu Ia přes periplasmu. Jakým způsobem se kolicin dostává přes vnější membránu zatím není zcela objasněno. Dosud nebyl nalezen sekundární protein vnější membrány (Omp), na který by se kolicin Ia byl schopný navázat. Existují teorie, podle kterých kolicin Ia přechází přímo přes Cir protein. To také naznačují výzkumy Buchanana a kolektivu (2007), podle kterých zátková doména v Cir proteinu brání přímému přechodu kolicinu přes něj, ale po navázání kolicinu na Cir může způsobit konformační změny zátkové domény (stejně jako kovové ionty, které tak mohou přímo procházet přes Cir protein, což je také jeho původní funkce). Podle pokusů Jakese a Finkelsteina (2010) s využitím hybridů kolicinů Ia a E3 byl navržen model, ve kterém kolicin Ia používá jeden protein Cir jako receptor a na vedlejší protein Cir se váže **translokační (N-terminální) doménou** a využívá ho tak k translokaci přes vnější membránu. N-terminální a C-terminální domény jsou propojeny s centrální doménou pomocí dvou extrémně dlouhých  $\alpha$ -helixů (délka zhruba 163Å).

**C-terminální doména** se skládá z 10  $\alpha$ -helixů z toho 8. a 9.  $\alpha$ -helix tvoří hydrofobní vlásenku (Obr.9) zanořenou v membráně a dalších 8  $\alpha$ -helixů je okolo ní položeno na povrchu lipidové dvojvrstvy (Wiener et al., 1997). Předpokládá se několik kroků do úplné formace kanálu. Nejdříve dochází k inzerci hydrofobní vlásenky (8. a 9.  $\alpha$ -helix) do cytoplasmatické membrány. Následně jako odpověď na cis-pozitivní napětí na povrchu membrány dochází k včlenění dalších dvou částí C-terminální domény do lipidové dvojvrstvy (1. a 6-7.  $\alpha$ -helix), zatímco druhý až pátý  $\alpha$ -helix je translokován na trans stranu membrány (Kienker et al., 2008). V určitých případech může být tento kanál tvořen pouze 3 transmembránovými segmenty (Kienker et al., 2000).

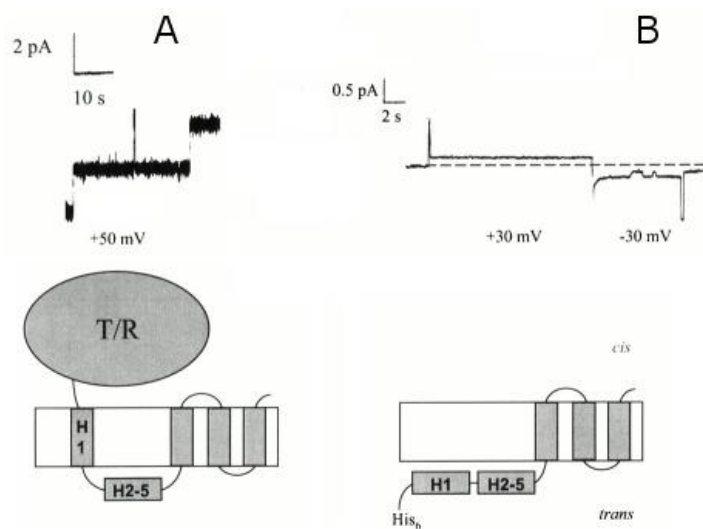
Porovnáním jednotlivých kanálů tvořených celým kolicinem Ia nebo jen jeho C-terminální doménou, které provedl Kienker a kolektiv (2000), se zdá, že pokud jsou kanály tvořeny celým kolicinem Ia, vznikají kanály o průměrné vodivosti 40 pS (při měření v 1M KCl a pH 6,2), zatímco pokud je použita pouze C-terminální doména, dochází ještě navíc ke



vzniku speciálních kanálů s velmi nízkou vodivostí (7 pS). A to nejspíš z toho důvodu, že v té chvíli je kanál tvořen pouze třemi namísto čtyř transmembránových segmentů,  $\alpha$ -helix 1 se totiž v případě samostatné C-terminální domény nezabudovává do membrány (Obr.10) (Kienker et al., 2000)



**Obr. 9:** Krystalová struktura kolicinu Ia (23-621), N-terminální doména – zelená, centrální doména – červená, C-terminální doména – modrá, hydrofóbní vlásenka – žlutá. Struktura PDB: 1CII.



**Obr. 10:** Porovnání jednoduchých kanálů celého kolicinu Ia s jeho C-terminální doménou, A – dva kolicinové kanály otevřené s relativně nízkou vodivostí a pod tím schématický model kolicinu Ia v otevřeném stavu s čtyřmi transmembránovými segmenty. B – příklad kanálu tvořeného pouze C-doménou, který před tím než se

zavře při záporném napětí prochází vyšším vodivostním stavem. Dole model C-domény při nízko-vodivém otevřeném stavu s třemi transmembránovými segmenty a  $\alpha$ -helixem H1 translokovaným přes membránu (převzato z Kienker et al., 2000), upraveno.

Metodou chemického propojování (cross-link) kolicinu Ia v lipidové dvojvrstvě a vizualizací kolicinu Ia inkorporovaného v membráně pomocí elektronové mikroskopie Greig a kolektiv (2009) dokázali existenci multimerů kolicinu Ia v lipidové dvojvrstvě. To samo o sobě ale neznamená, že jsou tyto vzniklé oligomery schopny tvořit funkční kanál.

### 2.2.7. Kolicin Ib

Kolicin Ib je produkován bakterií *Escherichia coli*. Na rozdíl od výše popsaného kolicinu Ia, není kolicin Ib dosud dobře prostudovaný. Byla u něj prokázána blízká příbuznost ke kolicinu Ia a z toho důvodu existuje mnoho studií porovnávajících tyto dva koliciny. Koliciny Ia a Ib jsou bazické proteiny, jejichž isoelektrický bod se pohybuje okolo 10 (Ia = 10,5; Ib = 9,53). Mají podobné složení aminokyselin. Vzhledem k tomu, že kompetují o absorpci k povrchu buňky, předpokládá se, že musí využívat podobné receptory a že značná část primární struktury kolicinů Ia a Ib je identická (Konisky et. al., 1972). Jediná zcela nehomologní sekvence kolicinů Ia a Ib je sekvence pro imunitní protein. Z toho vyplývá, že bakterie s imunitním proteinem kolicinu Ia není imunní proti kolicinu Ib a naopak (Mankovich et al., 1986). Kolicin Ib patří mezi koliciny schopné tvořit kanály a způsobovat tak depolarizaci vnitřní membrány a následný zánik buňky (Weaver et al., 1981).

### 2.2.8. Kolicin Js

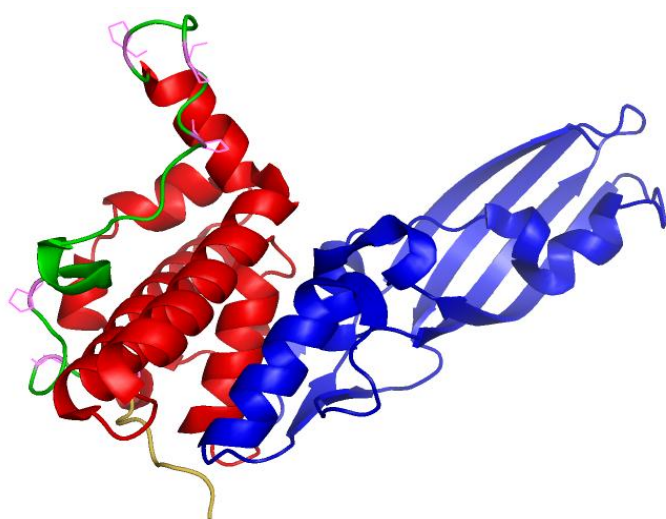
O kolicinu Js toho není zatím mnoho známo. Kolicin Js, jinak také nazývaný kolicin typu 7, je produkován bakterií *Shigella sonnei*. Je to dosud nejmenší objevený kolicin (třikrát menší než další nejmenší kolicin M), skládá se jen z 94 aminokyselin. Podobá se velikostí spíše mikrocinům než kolicinům, ale narozdíl od nich nemá v genomu zakódované žádné geny pro posttranslační modifikaci. Není ale nijak homologní ani s aminokyselinovou strukturou kolicinů (Šmajš and Weinstock, 2001).

### 2.2.9. Kolicin K

Kolicin K je pórtvorný protein produkován *Escherichia coli*. Jeho centrální doména se váže na Tsx nukleosid-specifický receptor a N-terminální doména se váže na receptor OmpA a OmpF, následně dochází k translokaci přes vnější membránu. Poté N-terminální doména interaguje s proteiny TolA, TolB, TolR a TolQ, čímž je zajištěn přenos přes periplasmu (Barnéoud-Arnoulet et al., 2010). Zatímco C-terminální doména je schopna tvořit napěťově ovládané membránové kanály (Schein et al., 1978).

### 2.2.10. Kolicin M

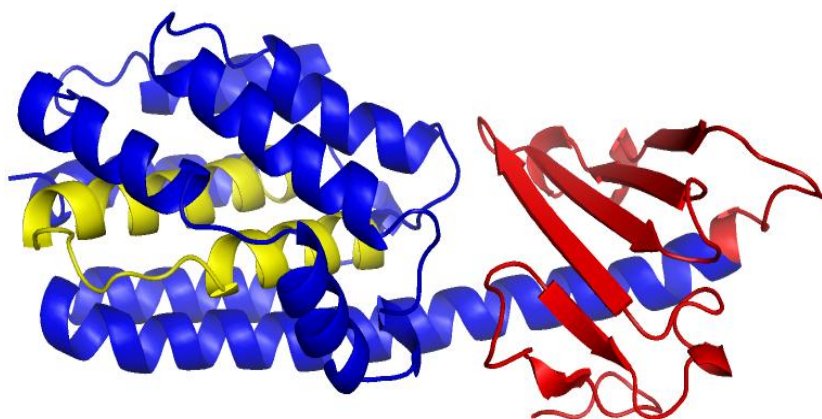
Kolicin M (Obr.11), syntetizovaný bakterií *Escherichia coli* přerušuje biosyntézu peptidoglykanu tím, že degraduje jeho undekaprenyl-fosfátové prekurzory. **N-terminální doména** je nejflexibilnější částí kolicinu, což zdůrazňuje šest prolinových zbytků. Na této doméně se také nachází TonB box (místo, na které je schopen se navázat TonB protein). TonB box je následován nestrukturovaným záhybem, který formuje smyčkovou strukturu a ovíjí celou střední doménu, tato flexibilita je předpokladem pro navázání N-terminální domény na TonB (pomocí TonB boxu). Stabilizovaná je především pomocí vodíkových můstků mezi ní a centrální doménou. Podle spekulativního modelu Zetha a kolektivu (2008) se na N-konci kolicinu M nachází TonB box a na receptoru FhuA (ferrichromovaný receptor) je také TonB box. Pro správné fungování kolicinu je navázání obou dvou důležité. Energie poskytnutá proteinem TonB je zřejmě schopná změnit strukturu receptoru FhuA a tím je umožněn přechod proteinu do periplazmy. Nejdříve se TonB naváže na FhuA a pak teprve ke kolicinu M. Pór FhuA se otevírá pomocí proton-motivní síly. **Centrální doména** je globulární a celá  $\alpha$ -helikální. Je složená z šesti  $\alpha$ -helixů různé délky, z nichž pět se ovíjí okolo toho nejdelšího. První  $\alpha$ -helix zřejmě zprostředkovává kontakt s cytoplazmatickou membránou. Helixy  $\alpha 3$  a  $\alpha 6$  formují hydrofobní jádro centrální domény. Centrální doména a C-terminální doména jsou spojeny malým  $\beta$ -listem pomocí vodíkových můstků. **C-terminální doména** je kombinovaná  $\alpha$  i  $\beta$  strukturami, nejvíce obsahuje  $\beta$ -barely. Má fosfatázovou aktivitu a odštěpuje C<sub>55</sub> (lipidický zbytek – baktoprenol) od pyrofosfátu a zbytku vzniklého meziproduktu (-PP-MurNAc-pentapeptid-GlcNAc), čímž brání další produkci peptidoglykanu (Zeth et al., 2008).



**Obr. 11:** Krystalová struktura kolicinu M (2-271), N-terminální doména – zelená, centrální doména – červená, C-terminální doména – modrá, TonB box – žlutý, prolinové zbytky - růžové. Struktura PDB: 3DA4.

### 2.2.11. Kolicin N

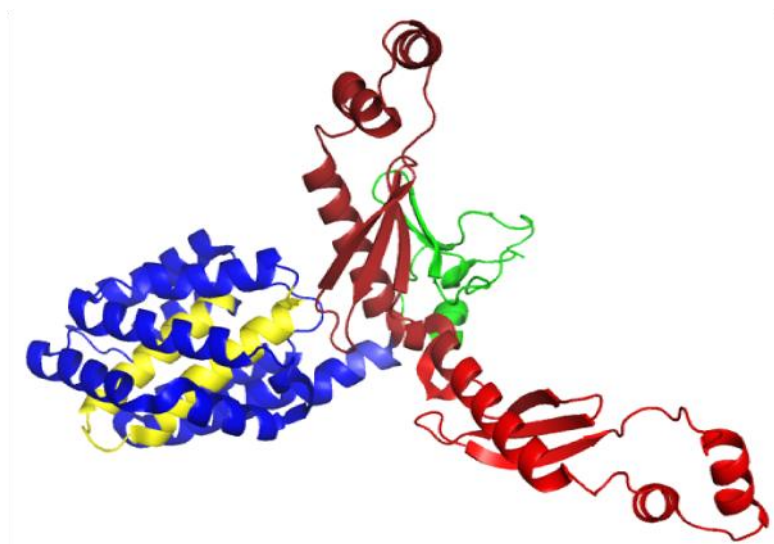
Pórotvorný kolicin N (Obr.12) je syntetizován bakterií *Escherichia coli*. Jeho **N-terminální doména (T)** se nachází mezi 17. a 66. aminokyselinovým zbytkem a její sekundární struktura není zcela patrná kvůli její flexibilitě. Obsahuje velmi důležitou oblast (zbytky 58-61), kterou se navazuje na protein TolA. **Centrální doména (R)** má 6ti-vláknový antiparalelní  $\beta$ -list obtočený okolo 63 Å dlouhého N-konce  $\alpha$ -helixu C-terminální domény (spojuje centrální a C-terminální doménu). Tato doména se váže pouze na jeden receptor a to na trimerní porin OmpF a přes něj se i translokuje (interakce mezi pozitivně nabitým povrchem kolicinu a negativně nabitým povrchem smyčky porinu OmpF) (Vetter et al., 1998). **C-terminální doména** má 10  $\alpha$ -helixů, z toho dva nejdelší (8. a 9.  $\alpha$ -helix) tvoří hydrofobní vlásenku v apolárním jádře kanálové domény. Po počáteční interakci proteinu s membránou zastává vlásenka zřejmě funkci kotvy (tato doména musí podstoupit mnoho konformačních změn, aby se včlenila do membrány). Vlásenka je obklopena ostatními osmi  $\alpha$ -helixy, které jsou položeny na membráně (Cascales et al., 2007).



**Obr. 12:** Krystalová struktura kolicinu N (chybí N-terminální doména) (91-386), centrální doména – červená, C-terminální doména – modrá, hydrofobní vlásenka – žlutá. Struktura PDB: 1A87.

### 2.2.12. Kolicin S4

Kolicin S4 (Obr.14) je kanálotvorný a je produkován bakterií *Escherichia coli*. Má strukturu ve tvaru písmene Y, kde dvě indentické receptor-vázající (centrální) domény tvoří ramena. Colicin S4 používá porin OmpW (8mi-vláknový  $\beta$ -barel neznámé funkce, který formuje hydrofobní kanály) jako receptor a OmpF a část Tol-systému pro translokaci. Podle měření získaných Arnoldem a kolektivem (2009) je **N-terminální doména** kolicinu S4 z 98% homologní s N-terminální doménou kolicinu K, až na to, že jí chybí Tol-box. Tato doména nemá zcela definovanou sekundární strukturu a to kvůli její vlastní flexibilitě. Ale její viditelná část se skládá z antiparalelního  $\beta$ -listu, tvořeného třemi vlákny ( $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\beta$ 3, přičemž mezi listy  $\beta$ 1 a  $\beta$ 2 je smyčka bohatá na glycin) propojeného s centrální doménou krátkým  $\alpha$ -helixem a s druhou centrální doménou pomocí  $\beta$ 1 listu. Kolicin S4 má **dvě centrální domény**, které jsou téměř identické a jsou unikátní, protože jejich sekvence není podobná žádnému známému kolicinu. Také proto, že se váže na drobný protein OmpW, je Tol-dependentní (A skupina) a především proto, že se v kolicinu vyskytuje ve dvou kopiích. Skládají se ze tří antiparalelních  $\beta$ -listů, následovaných třemi  $\alpha$ -helixy. **C-terminální doména** se nejvíce podobá doménám kolicinů A (Martinez et al., 1983), B (Lambotte et al., 1998) a N (Zakharov and Cramer, 2002). Také se skládá ze 10  $\alpha$ -helixů a z toho 8. a 9.  $\alpha$ -helix tvoří vlásenku (Arnold et al., 2009).



**Obr. 13:** Krystalová struktura kolicinu S4 (67-499), N-terminální doména – zelená, dvě centrální domény – červené, C-terminální doména – modrá, hydrofobní vlásenka – žlutá. Struktura PDB: 3FEW.

### 2.2.13. Kolicin U

Pórotvorný kolicin, produkovaný bakterií *Shigella boydii*. Kolicin U působí na kmeny bakterií *Escherichia* a *Shigella*. **N-terminální doména** kolicinu U se nejvíce podobá doméně bakteriocinu 28b (*Serratia marcescens*), který je jediným známým kolicinem kódovaným na chromozomu (Viejo et al., 1992). Vazba **centrální a N-terminální** domény je zprostředkována proteiny OmpF, OmpA a jádru lipopolysacharidů, dále pak dochází k interakci s komplexem proteinů TolABQR. Při použití *ompA* delečních mutant se prokázala velmi nízká senzitivita buňky, z čehož se dá usuzovat, že protein OmpA je jedním z klíčových proteinů translokace kolicinu U. **C-terminální doména** se nejvíce podobá C-terminální doméně kolicinů B a A (Smajs et al., 1997). Stejně jako u ostatních pórotvorných kolicinů obsahuje C-terminální doména hydrofobní vlásenku (z  $\alpha$ -helixů 8 a 9) a dalších 8 amfipatických  $\alpha$ -helixů rozložených okolo (Pilsel et al., 1998). Nejbližším příbuzným kolicinem kolicinu U je dodnes nepříliš prozkoumaný kolicin Y, který byl prozatím zkoumán především v souvislosti s funkcí imunitních proteinů (Šmajs et al., 2008). Právě z důvodu vysoké sekvenční homologie mezi oběma koliciny se nebudu kolicinem Y podrobněji zabývat.

## 2.3. Pórotvorné koliciny

### 2.3.1. Struktura póru

Kanály tvořené pórotvornými koliciny jsou napětově ovládané, což je dokázáno mnoha studiemi (Schein et al., 1978; Pressler et al., 1986; Bourdineaud et al., 1990 a další), z čehož vyplývá, že i po zabudování některých  $\alpha$ -helixů musí docházet k drobným konformačním změnám, které zajišťují otevírání a zavírání kanálů. To znamená především včleňování některých částí C-terminální domény do hydrofóbních částí lipidové dvojvrstvy vnitřní membrány. Například na kolicinu Ia byla tato problematika studována velmi podrobně. Takže jsme dnes na základě zatím provedeného výzkumu schopni určit umístění mnoha zbytků obsažených v C-terminální doméně kolicinu Ia, především pak orientaci hydrofóbní vlásenky v lipidové dvojvrstvě. Tyto výzkumy byly prováděny hlavně pomocí experimentů využívajících biotin-streptavidinový systém, tedy streptavidinové vychytávání cysteinů značených biotinem na cis a trans stranách membrány. Nejdříve bylo nutné vytvoření a purifikace proteinů s cíleně mutovanými cysteiny, které bylo cílem zviditelnit (Kienker et al., 1997). Mimo jiné bylo touto metodou zjištěno, že 68-zbytkový segment C-terminální domény kolicinu Ia (od Leu474 do Tyr541), který v solubilním stavu odpovídá  $\alpha$ -helixům 2-5, se u

otevřeného kanálu translokuje do vnitřku buňky. Stejně tak u helixů 8 a 9 tvořících hydrofobní vlásenku.

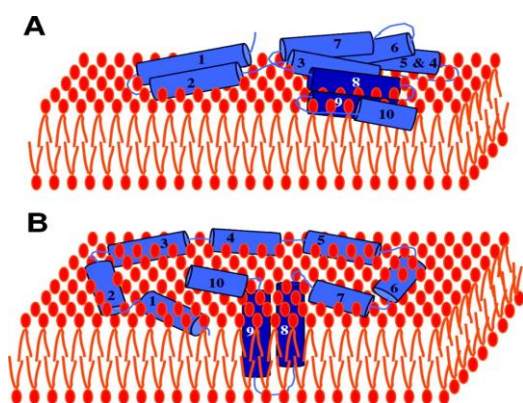
Struktura otevřeného kolicinového kanálu dodnes není zcela definovaná, což je dáno především tím, že podle dosud nalezených informací jsou kolicinové póry monomerní (Kienker and Slatin, 2003) a oligomery membránových kanálů se obecně lépe krystalizují. Navíc C-terminální doména, skládající se z 10  $\alpha$ -helixů, není pro tvorbu kanálu využívána celá, jak je dokázáno například u kolicinu A, E1 a Ia. Otevřený kanál se zřejmě skládá pouze ze čtyř  $\alpha$ -helixů, z nichž dva tvoří hydrofóbní vlásenku ( $\alpha$ -helixy 8 a 9) a dva jsou hydrofilní (Zakharov and Cramer, 2002). Dosud není známo mnoho proteinů schopných tvořit monomerní póry, proto není snadné si představit strukturu otevřeného kanálu tvořeného pouze čtyřmi  $\alpha$ -helixy. Výjimkou je protein Diphtheria toxin a několik dalších, které mají podobnou strukturu (Parker and Feil, 2005)

Velikost kolicinového póru se pohybuje okolo 10 Å, ale definitivní hodnota je těžko identifikovatelná. Výzkumy zatím naznačují pouze to, že póry, tvořené kolicinem Ia, mají zatím nejmenší známý průměr 7 Å (Krasilnikov et al., 1998). Dále pak u kolicinů A, E1 a Ib byl stanoven průměr v nejužší části na 8-9 Å (Raymond et al., 1985; Bullock et al., 1992). Navzdory současným informacím je podle některých odborníků pravděpodobné, že značná část kanálů, vznikajících v membráně, jsou dimery či oligomery (Zakharov a Cramer, (2002).

Společným znakem všech dosud známých a prozkoumaných pórtvorných kolicinů je základní struktura C-terminální domény, která je u nich velmi podobná. C-terminální doména se skládá z 10  $\alpha$ -helixů, z nichž dva ( $\alpha$ -helixy 8 a 9) se inkorporují do membrány a tvoří tak hydrofóbní vlásenku. Ostatních osm  $\alpha$ -helixů je rozloženo okolo ní na povrchu membrány. Jak jsem již zmínila výše, existují dva modely pro polohu inzertované domény a to model umbrella (deštníku) a model penkníže (kapesního nože) (viz obr. 14). Modely umbrella a penkníže předpokládají, že 8 amfipatických  $\alpha$ -helixů je nahromaděno na membránovém povrchu, naproti tomu výzkumy Zakharova a kolektivu (1998) poukazují na možnost, že tyto  $\alpha$ -helixy jsou seřazeny ve dvou-dimenzionálních řadách slabě nebo zcela neinteragujících  $\alpha$ -helixů. Toto pak potvrzují i solid-state NMR experimenty na kolicinu Ia (Huster et al., 2002). Prieto a Lazaridis (2011) studovali a simulovali C-terminální domény kolicinů A, B, E1, Ia a snažili se je vzájemně porovnat v souvislosti se schopností tvořit umbrella model. Zjistili, že pro koliciny B a Ia je model umbrella stabilní, zatímco pro koliciny A a E1 mají obě orientace vlásenky (model umbrella i penkníže) stejnou efektivní energii. Konformace penkníže je u kolicinů Ia a E1 více kompaktní než model umbrella. U kolicinu E1 Padmavathi a Steinhoff (2008) předpokládají správnost modelu umbrella, což je podpořeno měřením s využitím



různých metod, jako je solid-state NMR (Kim et al., 1998), FRET (Tory and Merrill, 1999) a EPR (měření s využitím elektronové paramagnetické rezonance) (Shin et al., 1993). U kolicinu Ia pak můžeme předpokládat tentýž model podpořený měřeními na lipidických membránách (pomocí systému biotin-streptavidin) (Kienker et al., 1997). Kolicin A byl donedávna považován za ukázkový příklad kolicinu odpovídajícího modelu penknífe, podporovaly to výsledky měření jak metodou FRET tak s využitím disulfidických můstků (Duché et al., 1994) a další. Navzdory tomu dnes již existují i studie s opačnými výsledky poukazujícími na možnost, že kolicin A je schopen tvořit i umbrella model (Padmavathí et al., 2008)



**Obr. 14:** Schématické zobrazení C-terminální domény v uzavřeném stavu. Zavřené kolicinové kanály mohou zaujímat několik konformací navázání k membráně, dvě z nich jsou zde znázorněné. A – penknífe model založený na studiích kolicinu A, B- umbrella model předpokládaný u kolicinu E1. Tento obrázek nemá být považován za návrh sekundární struktury proteinu znázorňující krystalickou strukturu (převzato z Cascales et al., 2007).

### 2.3.2. Elongace $\alpha$ -helixů

Výše popsané koliciny A, B, E1 a Ia můžeme rozdělit na 2 typy podle délky vlásenky. Koliciny A a B mají dostatečnou délku vlásenky na to, aby přesáhla celou lipidovou dvojvrstvu podle modelu umbrella (okolo 20 zbytků). Naproti tomu koliciny E1 a Ia, mají vlásenku kratší, složenou pouze ze zbytků v rozmezí od 12 do 15 (Elkins et al., 1997; Wiener et al., 1997) tudíž zřejmě není schopná přesáhnout membránu. Z toho důvodu se u nich předpokládá elongace (prodloužení) helixů na úkor aminokyselinových zbytků v následných nedefinovaných částech proteinu. Tato teorie je ale prokázána pouze u kolicinu E1 a to konkrétně u helixu 3 (Wei et al., 2007) a helixů 4 a 5 (Ho and Merrill, 2009), tedy pouze u amfipatických helixů. Ze simulací Prieta a Lazaridis (2011) se dá soudit, že pro kolicin E1 je elongace helixů výhodná, nedochází k ní však u hydrofobní vlásenky, ale u amfipatických helixů. Elongace tudíž v tomto případě nepomáhá přesáhnout membránu. Tomu by mohlo napomoci samotné zúžení membrány. Ze simulací kolicinu Ia vyplývá, že pro něj elongace helixů není výhodná, tudíž k ní zřejmě vůbec nedochází (Prieto and Lazaridis, 2011).

### 2.3.3. Lipidy interagující s koliciny

Fosfolipidy jsou důležitou složkou všech cytoplasmatických membrán. Většina



bakterií má membránu ze 70% tvořenou fosfolipidy a z 25% proteiny. Fosfolipidy jsou amfipatické a mají hydrofilní hlavičky. V bakterii *Escherichia coli* jsou zastoupeny především tři typy fosfolipidů: ze 75% fosfatidyletanolamin, z 20% fosfatidylglycerol a z 5% kardiolipin (Zerrouk et al., 2008). Z mastných kyselin je zastoupena především kyselina palmitová (16:0), hexadecenová a oktadecenová (Marr and Ingraham, 1962). Membrána je stabilizována pomocí dvojmocných iontů  $Mg^{2+}$  a  $Ca^{2+}$ , které neutralizují negativní náboj fosfolipidů na vnitřní i vnější straně membrány, přičemž  $Ca^{2+}$  je vně a  $Mg^{2+}$  uvnitř (Chen and Cooper, 2002). Interakce proteinů s lipidy může silně záviset na druhu lipidů a taktéž aktivita všech integračních proteinů, může být silně ovlivňována lipidy (Lee, 2004).

#### **2.3.3.1. Inzerce C-terminální domény kolicinů do lipidové dvojvrstvy**

Podle Zakharova a Cramera (2002), čerpajících z dosud publikovaných informací o kolicinu E1, můžeme rozdělit tuto fázi inkorporace do membrány na několik částí: První je interakce kolicinu s membránou, kterou zajišťují elektrostatické interakce vznikající mezi kationovými zbytky na kolicinu a záporně nabitými lipidy v membráně (Zakharov et al., 1996). V dalším kroku dochází k rozvolnění proteinu na membránovém povrchu. Dále pak dochází k elongaci některých  $\alpha$ -helixů (týká se pouze některých kolicinů, např. kolicinu E1) a k inzerci  $\alpha$ -helixů (Zakharov and Cramer, (2002).

#### **2.3.3.2. Interakce kolicinů s lipidovou dvojvrstvou**

Interakce C-terminální domény pórotvorných kolicinů s membránou je zřejmě klíčová pro vznik funkčních kanálů. Velice důležitým předpokladem pro správně fungující koliciny je konformační flexibilita. Procesy inzerce  $\alpha$ -helixů C-terminální domény kolicinu do membrány jsou náročné na pohyblivost jednotlivých částí domén. V návaznosti na tuto skutečnost vyplývá potřeba co nejnižší pohyblivosti částí u jednotlivých  $\alpha$ -helixů, protože čím více je potřeba větších konformačních změn, tím vyšší by měla být rigidita helixů (Zakharov and Cramer, 2002). Podle dosud provedených studií se soudí, že aniontové hlavičky lipidů na povrchu membrány inzerce vlásenky nebrání, ale naopak ji usnadňují. Stupeň pohyblivosti závisí na obsahu aniontových lipidů a také na koncentraci iontů v okolí (Yao and Hong, 2005). Dále je také nezbytná vhodná fluidita membrány (Zakharov et al., 2004b).

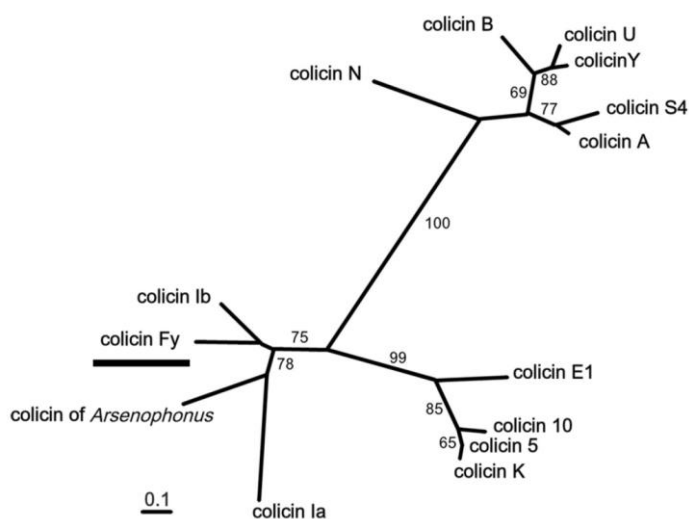
#### **2.3.3.3. Toroidální model póru**

Existuje model řešící problém s otázkou, jak mohou být póry tvořené koliciny pouze monomerní a zároveň mít tak velký průměr (nejméně 7 Å). Tuto otázku se snaží zodpovědět

toroidální model. Ten byl původně navržen pro skupinu malých antimikrobiálních peptidů, nejdříve pro magainin (Matsuzaki et al., 1998). Podle teorie toroidního póru jsou lipidy v bezprostřední blízkosti inkorporovaného kolicinu součástí vzniklého kanálu. Tedy fosfolipidové hlavičky tvoří stěnu póru společně s několika  $\alpha$ -helixy C-terminální domény. (Zakharov et al., 2004b). Tento model podporují studie sledující citlivost pórtvorné aktivity v lipidickém zakřivení a především měření prováděná na kolicinu E1 (Sobko et al., 2006b). Zjistilo se, že pozitivní spontánní zakřivení membrány vede ke stimulaci pórtvorné aktivity, zatímco negativní zakřivení ji inhibuje (Matsuzaki et al., 1998).

### 3. Kolicin F<sub>Y</sub>

Jedná se o nový druh kolicinu, nedávno objevený na Masarykově univerzitě v Brně. Tohoto kolicinu se týká má další experimentální práce. Kolicin F<sub>Y</sub> je produkován kmenem bakterií *Yersinia frederiksenii*. Kmeny bakterie *Yersinia frederiksenii* je většinu života komenzální, pouze příležitostně můž být patogenní a žije ve zvířecích i lidských střevech. Jak bylo zjištěno, je kolicin F<sub>Y</sub> schopen aktivně působit na patogenní i nepatogenní kmeny rodu *Yersinia* a neúčinněji působí na druh *Yersinia enterocolitica*. Na plazmidu YF27601 byl identifikován gen pro samotný kolicin a imunitní gen. Aminokyselinová sekvence odpovídající C-terminální doméně je nejbližší C-terminální pórtvorné doméně kolicinu Ib (z 69% identická s C-terminální doménou kolicinu Ib zakódovaného v genomu *Yersinia ruckeri*) (Obr.15).



**Obr. 15:** Fylogenetický strom pórtočvorných domén kolicinů. Tento strom byl vytvořen na základě sekvenčních dat kolicinových genů. Čárové měřítko reprezentuje 0,1 náhrady nukleotidu na místě (převzato z Bosák et al., 2012).

Kolicin F<sub>Y</sub> obsahuje 438 aminokyselinových zbytků a vypočítaná molekulární hmotnost odpovídá 49,6 kDa. Na N-konci kolicinu F<sub>Y</sub> byl nalezen TonB box, což naznačuje, že součástí transportního mechanismu kolicinu F<sub>Y</sub> je TonB protein, tudíž můžeme

předpokládat, že patří ke kolicinové skupině B. Podle dosavadních zjištění Bosáka a kolektivu (2012) má kolicin  $F_Y$  svůj specifický receptor, což by mohl být protein YiuR. Funkce YiuR zatím není zcela známá, ale podle výzkumu Kirillinové a kolektivu (2006) na bakterii *Yersinia pestis* by receptor YiuR mohl být součástí transportního systému železa. Tento protein je součástí vnější bakteriální membrány a jeho přítomnost v ní se ukázala být nezbytná pro účinnost kolicinu  $F_Y$  stejně jako protein TonB. Objevená částečná křížová imunita kmenů syntetizujících kolicin  $F_Y$  a kmenů s kolicinem Ib, nasvědčují možnosti, že jak kolicin  $F_Y$  s YiuR, tak kolicin Ib s Cir, mají společný evoluční původ. Gen *yiur* se liší u různých druhů *Yersinie* (např. YiuR u *Yersinia pseudotuberculosis* je tak odlišný, že je zřejmě díky tomu resistantní proti kolicinu  $F_Y$  na rozdíl od *Yersinia kristensenii* apod.). Provedení sekvenční analýzy oblasti kódující syntézu kolicinu  $F_Y$  dále ukázalo, že kolicin  $F_Y$  obsahuje SOS box (místo vázající LexA), což naznačuje jistý stupeň SOS regulace syntézy kolicinu  $F_Y$  (Bosák et al., 2012).

### 3.1. *Yersinia frederiksenii*

*Yersinia frederiksenii* je jedním z 11 druhů bakterií rodu *Yersinia*. Bohužel, patří do skupiny druhů téměř neprozkoumaných, které jsou občas nazývány „druhy podobné *Yersinii enterocolitica*“. Tento druh byl identifikován nejen ve střevech domácích zvířat a lidí, ale také ve vodě a jídle. Je považována za primárně nepatogenní druh (Sulakvelidze, 2000). Tato bakterie je velmi heterogenní druh, a proto také zahrnuje čtyři skupiny blízce příbuzných kmenů *Yersinia frederiksenii* (Ursing and Aleksic, 1995) citováno podle (Sulakvelidze, 2000).

### 3.2. Experimentální část

#### 3.2.1. Cíl práce

Hlavním cílem mé experimentální práce bylo dokázat pórtvornost kolicinu  $F_Y$ , prokázat či vyvrátit předpoklad závislosti aktivity kolicinu  $F_Y$  na přítomnosti  $Ca^{2+}$  a zjistit průměrnou vodivost tvořených kanálů.

#### 3.2.2. Metody

Měření na černých lipidových membránách (BLM, Black Lipid Membranes): tato metoda umožňuje charakterizaci elektrických vlastností zkoumaných proteinů, které jsou zabudované do uměle vytvořené fosfolipidové dvojvrstvy. Celá aparatura pro toto měření je sestavená v Laboratoři fyziologie bakterií na katedře genetiky a mikrobiologie. Používala

jsem teflonovou kyvetu rozdělenou přepážkou s malým otvorem uprostřed o definovaném průměru ( $0,8\text{mm}^2$ ).

Na obou stranách membrány byl roztok 1M KCl (p.a., Lach-Ner) s pufrem HEPES (10 mM, Sigma) a celkovém objemu maximálně 8 ml s následně přidaným  $\text{CaCl}_2$  (p.a., Lach-Ner) o celkové koncentraci 2 mM (při pH 6,2 a pokojové teplotě). Do tohoto roztoku jsem na každou stranu přepážky ponořila argento-chloridové elektrody se solnými můstky (Theta).

Přes již zmíněný otvor v přepážce byla nanášena směs organických rozpouštědel s fosfolipidy, které následně vytvořily fosfolipidovou dvojvrstvu. Používala jsem směs azolektinu (Fluka 11145, soja) s dekanem a butanolem (Sigma); 6 mg azolektinu, 180  $\mu\text{l}$  dekanu, 20  $\mu\text{l}$  butanolu. Asi 1  $\mu\text{l}$  směsi jsem nanášela pomocí plastové kličky. Nejprve byl proveden kontrolní záznam, prokazující, že se do membrány neinkorporují žádné kanálotvorné proteiny (tedy kontaminace). Poté jsem do 4 ml roztoku na cis straně (tedy na straně s ponořenou kladnou elektrodou) vnesla 1  $\mu\text{l}$  kolicinu  $\text{F}_Y$  (původní koncentrace 0,1 mg/ml). Finální koncentrace kolicinu tedy byla 25 ng/ml. Pracovala jsem s kolicinem připraveným a purifikovaným v Biologickém ústavu Lékařské fakulty na Masarykově univerzitě, podle dříve popsanych postupů (Bosák et al., 2012). Proud procházející membránou byl zesilován zesilovačem LCA-200-100G (zesílení 100GV/A, Femto) a zaznamenáván pomocí A/D-převodníku (KPCI-3101, Keithly). Sběr dat byl zajišťován programem BLM2 (Jiří Bok, MFF, UK). Schéma zapojení aparatury je dostupné na <http://pcfiser.natur.cuni.cz/BLM/scheme.png>. Souběžně se záznamem proudu (I), procházejícím vznikajícími kanály, bylo snímáno i napětí (U) na membráně (většinou hodnoty 36 mV, 54 mV, 72 mV a 91 mV). Ke zpracování dat jsem využívala program QuB (<http://www.qub.buffalo.edu/>). Pomocí hodnot získaných z tohoto měření a vzorce  $G = I/U$  jsem vypočítala vodivost jednotlivých kanálů vzniklých na membráně, přičemž G je vodivost  $[S] = [\Omega^{-1}]$ . Pro porovnání četnosti jednotlivých kanálů o různých vodivostech jsem pomocí procesoru Gnumeric vytvořila histogram.

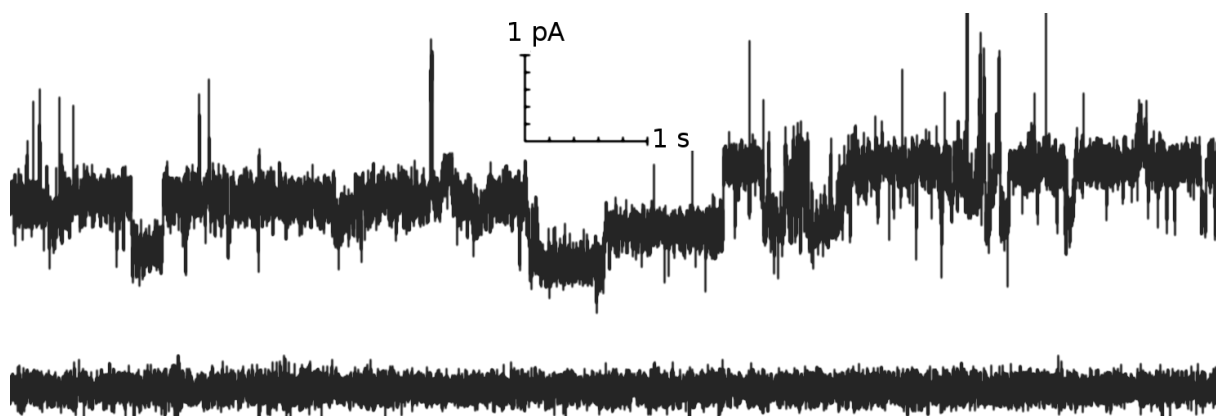
### 3.2.3. Výsledky a diskuze

#### 3.2.3.1. Závislost aktivity kolicinu $\text{F}_Y$ na $\text{Ca}^{2+}$

Pro zjištění závislosti aktivity kolicinu na iontech  $\text{Ca}^{2+}$  byl pokus nejprve prováděn v čistém roztoku 1M KCl a později po přidavku  $\text{CaCl}_2$ . Ionty  $\text{Ca}^{2+}$  jsem přidávala ve formě  $\text{CaCl}_2$  o celkové koncentraci 2 mM v roztoku. Závislost aktivity kolicinu  $\text{F}_Y$  na přítomnosti iontů  $\text{Ca}^{2+}$  jsem zjišťovala kvůli tomu, že mohou ovlivňovat celkovou četnost

zabudovávaných kanálů v membráně. Na základě pokusů Sobka et al., (2006a) s kolicinem E1 se zjistilo, že vliv  $\text{Ca}^{2+}$  závisí na složení lipidové dvojvrstvy. U membrán s negativně nabitými fosfolipidy se po přidání  $\text{Ca}^{2+}$  snižuje počet zabudovávaných molekul kolicinu, zatímco u neutrálních fosfolipidových dvojvrstev nemá přidání  $\text{Ca}^{2+}$  žádný vliv. Kanály kolicinu E1 se formují lépe při pozitivním spontánním zakřivení membrány a při negativním je to naopak (Sobko et al., 2006b), tudíž efekt  $\text{Ca}^{2+}$  na fosfolipidovou dvojvrstvu zřejmě spočívá v tom, že se kationty váží na negativně nabitě hlavičky fosfolipidů, tím se snižuje napětí mezi nimi a dochází ke změnám ve spontánním zakřivení fosfolipidů (Sobko et al., 2006a). Předešlá měření zjistila vliv  $\text{Ca}^{2+}$  v kombinaci se složením membrány i na vodivost jednotlivých kanálů (po přidání  $\text{Ca}^{2+}$  do neutrální membrány se nejčastěji objevovaly póry o vodivosti 65pS a 600pS, při zvyšování množství negativně nabitých fosfolipidů v membráně vodivost klesla na 6pS a 280pS) (Sobko et al., 2004). U většiny měření, prováděných na kolicinech, se  $\text{CaCl}_2$  využívá přímo jako součást roztoku KCl, protože všeobecně jsou ionty  $\text{Ca}^{2+}$  považovány za stabilizátory membrán (Pressler et al., 1986; Kienker et al., 2000; Nardi et al., 2001).

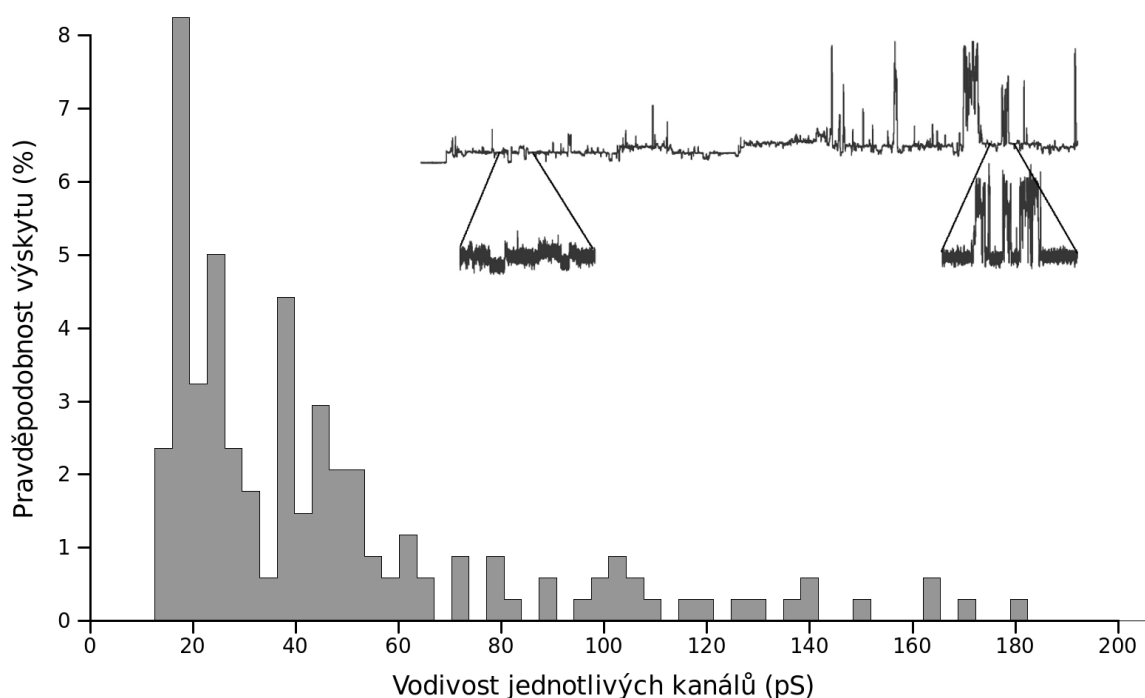
Při měření s kolicinem  $F_Y$  bez  $\text{CaCl}_2$  se netvořily žádné kanály, zatímco po následném přidání  $\text{CaCl}_2$  se kanály tvořit začaly (Obr.16).



**Obr. 16:** Závislost tvorby kanálů na koncentraci  $\text{Ca}^{2+}$ . Nahoře – tvorba kanálů po přidání  $\text{CaCl}_2$  Dole – před přidáním  $\text{CaCl}_2$ . Měření prováděno v 1M KCl s 10 mM HEPES, při pH 6,2 a pokojové teplotě, přidáno  $\text{CaCl}_2$  na konečnou koncentraci 2 mM. Dvojvrstva z azolektinu (Fluka 11145, soja) s dekanem a butanolem; 6 mg azolektinu, 180  $\mu\text{l}$  dekanu, 20  $\mu\text{l}$  butanolu. Koncentrace kolicinu 25ng/ml.

### 3.2.3.2. Vodivost jednotlivých kanálů kolicinu $F_Y$

Měřila jsem záznam při různém napětí a sledovala jsem vznik různých kanálů (Obr.17). Pro jejich zabudování bylo potřeba napětí větší než 36 mV, pak se ale dalo měřit i při nižším napětí. Ze záznamu jsem vytvořila histogram (Obr.17).

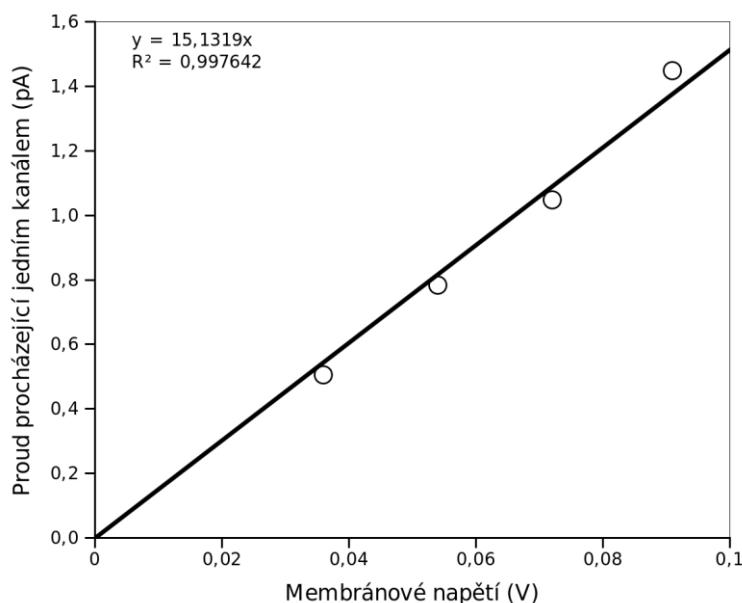


**Obr. 17:** Histogram četnosti kanálů o různých vodivostech a ukázkový záznam s tvorbou malých a velkých kanálů.

Je obtížné porovnávat vodivosti naměřené u různých kolicinů, protože tato měření probíhala v odlišných podmínkách. Tvorba kanálů závisí na mnoha podmínkách, jako je tloušťka membrány a její složení, napětí na membráně, pH, nebo koncentrace roztoku KCl apod. Přesto se pokusím porovnat vodivost kanálů tvořených kolicinem  $F_Y$  s kanály tvořenými jinými koliciny. Podle mých dosavadních měření se dá předpokládat, že kanály, tvořené kolicinem  $F_Y$ , obecně nedosahují tak vysokých vodivostí jako například kolicin E1 s nejvyšší vodivostí 600 pS (Sobko et al., 2006b). Pokud se ale budu zabývat menšími kanály, tak se póry kolicinu Ia s nejběžnější vodivostí okolo 40 pS shodují s vodivostí kanálů tvořených kolicinem Ib 41 pS (Weaver et al., 1981; Kienker et al., 2000). Tyto hodnoty odpovídají i vodivosti běžně se objevující i u kolicinu  $F_Y$ , což potvrzuje blízkou příbuznost kolicinu  $F_Y$  s koliciny I. Nižší vodivosti u většiny známých pórotvorných kolicinů nejsou běžné, zaznamenány byly pro kolicin B, kde byla stanovena průměrná vodivost kolicinem tvořených kanálů na 13,7 pS (Pressler et al., 1986). Všechna tato měření na černých lipidických membránách byla prováděna v KCl, pokaždé za mírně odlišných podmínek. Je zajímavé, že během experimentů se velmi často objevovaly reprodukovatelné menší kanály o vodivosti 15-

20 pS, které se běžně u příbuzných kolicinu  $F_Y$  nevyskytují. Mohlo by jít o nějaký nějaký neznámý stav (konformaci), kterou se podařilo náhodně zachytit.

**Obr. 18:** Graf závislosti proudu procházejícího jedním kanálem a napětí na membráně. Vodivost aktuálně sledovaného kanálu byla 15,1 pS. Měření prováděno v 1M KCl s 10 mM HEPES, při pH 6,2 a pokojové teplotě, přidáno  $CaCl_2$  na konečnou koncentraci 2 mM. Dvojvrstva z azolektinu (Fluka 11145, soja) s dekanem a butanolem; 6 mg azolektinu, 180  $\mu$ l dekanu, 20  $\mu$ l butanolu. Koncentrace kolicinu 25 ng/ml.



Na základě grafu závislosti proudu procházejícího jedním kanálem a napětím na membráně se dá předpokládat, že kolicin  $F_Y$  tvoří vodou naplněný kanál a ne jiný transportní systém.

Vzhledem k tomu, že závislost je lineární, dá se jí také říkat ohmická (odpovídá Ohmovu zákonu). Ačkoliv je potřeba relativně vysoké napětí pro otevření kanálu, tak při následné změně (snížení) napětí se už jeho vodivost (tedy také struktura) nemění. Existuje ale i možnost, že by sledovaná závislost mohla být pro napěťově řízené kanály spíše exponenciální, v tom případě by upřednostňovala vodivost jen v jednom směru (<https://wiki.brown.edu/confluence/display/Spring07BN0102S01/Ion+Channel+Function>). Napětí je zřejmě potřeba jen pro inkorporaci do membrány ale pak už strukturu kolicinu výrazně nemění.

### 3.3. Shrnutí

K vlastnímu výzkumu jsem používala metody s BLM. Sledovala jsem aktivitu membránových pórů kolicinu  $F_Y$ , zabudovávaných v umělé lipidické membráně v 1M KCl a při pH 6,2. Sledovala jsem závislost zabudovávání kolicinů na přítomnosti iontů  $Ca^{2+}$ .

Podařilo se mi ukázat, že kolicin  $F_Y$  je pórtvorný, že je závislý na membránovém napětí a je rovněž aktivováno ionty  $Ca^{2+}$ . Podle zjištěných hodnot proudu, procházejícího membránou, jsem byla schopna určit vodivost jednotlivých kanálů vzniklých v lipidické dvojvrstvě. Kromě nejčastěji se objevujících kanálů s vodivostí okolo 15-20 pS, se s celkem značnou četností objevovaly i kanály s vodivostí okolo 40 pS a dále pak i velké kanály okolo 100 pS.

#### 4. Závěr

Koliciny obecně využívají pro transport přes vnější membránu transmembránové proteiny, které mají odlišnou primární funkci. Nejdříve kolicin pomocí své centrální domény interaguje s membránovým receptorem a následně se pomocí N-terminální domény translokuje přes vnější membránu (pomocí OmpA a jiných proteinů vnější membrány) a periplazmatický prostor k vnitřní membráně.

Koliciny jsou často děleny právě podle mechanismu jejich translokace přes vnější membránu a periplazmatický prostor, na skupiny A a B. Pro skupinu A je charakteristické využívání transportního systému Tol-Pal (využívá proteiny TolA, TolB, TolQ, TolR a Pal). Pro skupinu B je zase charakteristické využití TonB systému (využívá proteiny TonB, ExbB a ExbD) (Lazdunski et al., 1998).

Inzerce C-terminální domény do vnitřní membrány je umožněna interakcí  $\alpha$ -helixů této domény se záporně nabitými fosfolipidy v membráně. Utvoří se hydrofobní vlásenka, která se podle posledních zjištění zanořuje alespoň částečně do membrány a tak zřejmě kolicin ukotvuje ve vnitřní membráně (Zakharov and Cramer, 2002). Poté dochází ke konečnému projevu toxického účinku kolicinu a to buď endonukleázovou aktivitou nebo tvorbou membránových pórů či degradací meziproduktů syntézy peptidoglykanu.

Podle dosavadních zjištění bylo prokázáno, že kanály, tvořené koliciny, mají jistou napětovou závislost (Pressler et al., 1986; Stroud et al., 1998; Kienker et al., 2000; Sobko et al., 2006b a další). Tyto kanály jsou s největší pravděpodobností monomerní (Kienker and Slatin, 2003). Na základě porovnání všech těchto poznatků s dosud zjištěnými fakty o kolicinu  $F_Y$ , předpokládám, že tento kolicin se s ostatními koliciny v mnoha věcech shoduje, ale zároveň existují mezi nimi značné odlišnosti, jako je například velmi častá tvorba kanálů o nižších vodivostech (15-20 pS), silný vliv  $Ca^{2+}$  na zabudovávání kolicinů do lipidové dvojvrstvy apod., kterými stojí za to se dále zabývat.

Studium kolicinů probíhá již více než 80 let a v poslední době je velmi aktuální. Nabývá na významu především proto, že se stále rozšiřuje jeho praktické využití. Koliciny, využívané jako vzoroví zástupci skupiny bakteriocinů, často slouží jako pomůcky ke studiu



funkce mnoha proteinů, jako jsou proteiny vnější membrány (OMP), proteiny TonB systému a Tol systému, se kterými koliciny interagují a další. Také je s jejich pomocí možné studovat mechanismus transportu jiných proteinů interagujících se stejným transportním systémem, viz známý příklad cefalosporinových antibiotik, která využívají stejný transportní systém (ToB systém) jako některé koliciny (Tatsumi et al., 1995). A dále pak se do budoucna nad nimi kvůli jejich specifitě uvažuje jako o alternativě antibiotik, proti kterým se čím dál častěji objevují multiresistentní kmeny bakterií (Cutler et al., 2007). Velké uplatnění koliciny nachází ve studiu struktur membránových pórů i všeobecné interakce protein-protein. V neposlední řadě se také uplatňují Col plasmidy v genové inženýrství.

Přestože má studium kolicinů velmi dlouhou tradici, je ještě v poznacích o kolicinech velmi mnoho neznámých, proto má stále význam v jejich studiu pokračovat.

Ve své další práci bych se chtěla dále věnovat především kolicinu F<sub>Y</sub> a následně také kolicinu U. Zaměřit bych se chtěla na měření aktivity kolicinů při různých podmínkách, jako je různá tloušťka membrány, různé lipidové složení membrány s různým nábojem apod., dále také na studium zakřivení membrány, topologii vzniklých kanálů a fluorescenční pokusy prokazující např. interakci kolicinu s konkrétními lipidy.

## 5. Seznam použité literatury

- Abergel, C., Bouveret, E., Claverie, J.-M., Brown, K., Rigal, A., Lazdunski, C., and Bénédicti, H. (1999). Structure of the *Escherichia coli* TolB protein determined by MAD methods at 1.95 Å resolution. *Structure* 7, 1291–1300.
- Alcaraz, A., Nestorovich, E.M., Aguilera-Arzo, M., Aguilera, V.M., and Bezrukov, S.M. (2004). Salting Out the Ionic Selectivity of a Wide Channel: The Asymmetry of OmpF. *Biophys J* 87, 943–957.
- Arnold, T., Zeth, K., and Linke, D. (2009). Structure and Function of Colicin S4, a Colicin with a Duplicated Receptor-binding Domain. *Journal of Biological Chemistry* 284, 6403–6413.
- Barnéoud-Arnoulet, A., Gavioli, M., Llobès, R., and Cascales, E. (2010). Interaction of the Colicin K Bactericidal Toxin with Components of Its Import Machinery in the Periplasm of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 192, 5934–5942.
- Barnes, B., Sidhu, H., and Gordon, D.M. (2007). Host Gastro-Intestinal Dynamics and the Frequency of Colicin Production by *Escherichia Coli*. *Microbiology* 153, 2823–2827.
- Bosák, J., Laiblová, P., Šmarda, J., Dědičová, D., and Šmajš, D. (2012). A novel colicin FY of *Yersinia frederiksenii* inhibits pathogenic *Yersinia* strains via YiuR-mediated reception, TonB import and cell membrane pore-formation. *Journal of Bacteriology*.
- Bourdineaud, J.P., Boulanger, P., Lazdunski, C., and Letellier, L. (1990). In vivo properties of colicin A: channel activity is voltage dependent but translocation may be voltage independent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 1037–1041.
- Bouveret, E., Derouiche, R., Rigal, A., Llobès, R., Lazdunski, C., and Benedetti, H. (1995). Peptidoglycan-Associated Lipoprotein-TolB Interaction. A Possible Key to Explaining the Formation of Contact Sites Between the Inner and Outer Membranes of *Escherichia Coli*. *J. Biol. Chem.* 270, 11071–11077.
- van den Bremer, E.T.J., Keeble, A.H., Jiskoot, W., Spelbrink, R.E.J., Maier, C.S., Van Hoek, A., Visser, A.J.W.G., James, R., Moore, G.R., Kleanthous, C., et al. (2004). Distinct conformational stability and functional activity of four highly homologous endonuclease colicins. *Protein Sci* 13, 1391–1401.
- Buchanan, S.K., Lukacik, P., Grizot, S., Ghirlando, R., Ali, M.M.U., Barnard, T.J., Jakes, K.S., Kienker, P.K., and Esser, L. (2007). Structure of colicin I receptor bound to the R-domain of colicin Ia: implications for protein import. *Embo J* 26, 2594–2604.
- Bullock, J.O., Kolen, E.R., and Shear, J.L. (1992). Ion selectivity of colicin E1: II. Permeability to organic cations. *J. Membr. Biol.* 128, 1–16.
- Butala, M., Zgur-Bertok, D., Busby, S.J.W., and S.J.W.Busby@bham.ac.uk (2009). The Bacterial LexA Transcriptional Repressor. *Cellular and Molecular Life Sciences* 66, 82–93.
- Cascales, E., Buchanan, S.K., Duché, D., Kleanthous, C., Llobès, R., Postle, K., Riley, M., Slatin, S., and Cavard, D. (2007). Colicin Biology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 71, 158–229.

- Cursino, L., Šmarda, J., Chartone-Souza, E., and Nascimento, A.M.A. (2002). Recent updated aspects of colicins of Enterobacteriaceae. *Brazilian Journal of Microbiology* 33, 185–195.
- Cutler, S.A., Lonergan, S.M., Cornick, N., Johnson, A.K., and Stahl, C.H. (2007). Dietary Inclusion of Colicin E1 Is Effective in Preventing Postweaning Diarrhea Caused by F18-Positive *Escherichia Coli* in Pigs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 3830–3835.
- Devanathan, S., and Postle, K. (2007). Studies on colicin B translocation: FepA is gated by TonB. *Molecular Microbiology* 65, 441–453.
- Duche, D., Baty, D., Chartier, M., and Letellier, L. (1994). Unfolding of colicin A during its translocation through the *Escherichia coli* envelope as demonstrated by disulfide bond engineering. *J. Biol. Chem.* 269, 24820–24825.
- Duché, D., Parker, M.W., González-Mañas, J.M., Pattus, F., and Baty, D. (1994). Uncoupled Steps of the Colicin A Pore Formation Demonstrated by Disulfide Bond Engineering. *J. Biol. Chem.* 269, 6332–6339.
- Duquesne, S., Destoumieux-Garzón, D., Peduzzi, J., and Rebuffat, S. (2007). Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *Natural Product Reports* 24, 708–734.
- Elkins, P., Bunker, A., Cramer, W.A., and Stauffacher, C.V. (1997). A mechanism for toxin insertion into membranes is suggested by the crystal structure of the channel-forming domain of colicin E1. *Structure* 5, 443–458.
- Ferguson, A.D., and Deisenhofer, J. (2004). Metal Import through Microbial Membranes. *Cell* 116, 15–24.
- Gillor, O., Giladi, I., and Riley, M.A. (2009). Persistence of colicinogenic *Escherichia coli* in the mouse gastrointestinal tract. *BMC Microbiology* 9, 165.
- Gillor, O., Vriezen, J.A.C., and Riley, M.A. (2008). The Role of SOS Boxes in Enteric Bacteriocin Regulation. *Microbiology* 154, 1783–1792.
- Gratia, J.-P. (2000). André Gratia: A Forerunner in Microbial and Viral Genetics. *Genetics* 156, 471–476.
- Greig, S.L., Radjainia, M., and Mitra, A.K. (2009). Oligomeric Structure of Colicin Ia Channel in Lipid Bilayer Membranes. *J Biol Chem* 284, 16126–16134.
- Hilsenbeck, J.L., Park, H., Chen, G., Youn, B., Postle, K., and Kang, C. (2004). Crystal structure of the cytotoxic bacterial protein colicin B at 2.5 Å resolution. *Molecular Microbiology* 51, 711–720.
- Ho, D., and Merrill, A.R. (2009). Evidence for the Amphipathic Nature and Tilted Topology of Helices 4 and 5 in the Closed State of the Colicin E1 Channel†. *Biochemistry* 48, 1369–1380.
- Huster, D., Yao, X., Jakes, K., and Hong, M. (2002). Conformational changes of colicin Ia channel-forming domain upon membrane binding: a solid-state NMR study. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1561, 159–170.
- Chen, C.Z., and Cooper, S.L. (2002). Interactions between dendrimer biocides and bacterial membranes. *Biomaterials* 23, 3359–3368.

- Ibañez De Opakua, A., Diercks, T., Viguera, A.R., and Blanco, F.J. (2010). NMR Assignment and Backbone Dynamics of the Pore-Forming Domain of Colicin A. *Biomolecular NMR Assignments* 4, 33–36.
- Jakes, K.S., and Finkelstein, A. (2010). The colicin Ia receptor, Cir, is also the translocator for colicin Ia. *Molecular Microbiology* 75, 567–578.
- James, R., Penfold, C.N., Moore, G.R., and Kleanthous, C. (2002). Killing of *E. coli* cells by E group nuclease colicins. *Biochimie* 84, 381–389.
- Journet, L., Rigal, A., Lazdunski, C., and Bénédicti, H. (1999). Role of TolR N-Terminal, Central, and C-Terminal Domains in Dimerization and Interaction with TolA and TolQ. *Journal of Bacteriology* 181, 4476–4484.
- Kampfenkel, K., and Braun, V. (1993). Topology of the ExbB Protein in the Cytoplasmic Membrane of *Escherichia Coli*. *J. Biol. Chem.* 268, 6050–6057.
- Kienker, P., and Slatin, S. (2003). Colicin channels and protein translocation. In *Pore-forming Peptides and Protein Toxins*, P. Lazarovici, M. Dalla Serra, and G. Menestrina, eds. (CRC Press), pp. 102–131.
- Kienker, P.K., Jakes, K.S., and Finkelstein, A. (2000). Protein Translocation across Planar Bilayers by the Colicin Ia Channel-Forming Domain. *J Gen Physiol* 116, 587–598.
- Kienker, P.K., Jakes, K.S., and Finkelstein, A. (2008). Identification of Channel-Lining Amino Acid Residues in the Hydrophobic Segment of Colicin Ia. *J Gen Physiol* 132, 693–707.
- Kienker, P.K., Qiu, X., Slatin, S.L., Finkelstein, A., and Jakes, K.S. (1997). Transmembrane insertion of the colicin Ia hydrophobic hairpin. *J. Membr. Biol.* 157, 27–37.
- Kim, Y., Valentine, K., Opella, S.J., Schendel, S.L., and Cramer, W.A. (1998). Solid-state NMR studies of the membrane-bound closed state of the colicin E1 channel domain in lipid bilayers. *Protein Sci* 7, 342–348.
- Kirillina, O., Bobrov, A.G., Fetherston, J.D., and Perry, R.D. (2006). Hierarchy of Iron Uptake Systems: Yfu and Yiu Are Functional in *Yersinia Pestis*. *Infect. Immun.* 74, 6171–6178.
- Koebnik, R., Locher, K.P., and Van Gelder, P. (2000). Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Molecular Microbiology* 37, 239–253.
- Konisky, J., (1972). Characterization of Colicin Ia and Colicin Ib CHEMICAL STUDIES OF PROTEIN STRUCTURE. *J. Biol. Chem.* 247, 3750–3755.
- Krasilnikov, O.V., Da Cruz, J.B., Yuldasheva, L.N., Varanda, W.A., and Nogueira, R.A. (1998). A Novel Approach to Study the Geometry of the Water Lumen of Ion Channels: Colicin Ia Channels in Planar Lipid Bilayers. *Journal of Membrane Biology* 161, 83–92.
- Krewulak, K.D., and Vogel, H.J. (2008). Structural biology of bacterial iron uptake. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1778, 1781–1804.
- Konisky, J., (1972). Characterization of Colicin Ia and Colicin Ib CHEMICAL STUDIES OF PROTEIN STRUCTURE. *J. Biol. Chem.* 247, 3750–3755.

- Lambotte, S., Jasperse, P., and Bechinger, B. (1998). Orientational Distribution of  $\alpha$ -Helices in the Colicin B and E1 Channel Domains: A One and Two Dimensional  $^{15}\text{N}$  Solid-State NMR Investigation in Uniaxially Aligned Phospholipid Bilayers†. *Biochemistry* 37, 16–22.
- Lazdunski, C.J., Bouveret, E., Rigal, A., Journet, L., Lloubès, R., and Bénédicti, H. (1998). Colicin Import into Escherichia Coli Cells. *J. Bacteriol.* 180, 4993–5002.
- Lazzaroni, J.-C., Dubuisson, J.-F., and Vianney, A. (2002). The Tol proteins of Escherichia coli and their involvement in the translocation of group A colicins. *Biochimie* 84, 391–397.
- Lee, A.G. (2004). How lipids affect the activities of integral membrane proteins. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1666, 62–87.
- Lloubès, R., Cascales, E., Walburger, A., Bouveret, E., Lazdunski, C., Bernadac, A., and Journet, L. (2001). The Tol-Pal proteins of the Escherichia coli cell envelope: an energized system required for outer membrane integrity? *Research in Microbiology* 152, 523–529.
- Mankovich, J.A., Hsu, C.H., and Konisky, J. (1986). DNA and Amino Acid Sequence Analysis of Structural and Immunity Genes of Colicins Ia and Ib. *J. Bacteriol.* 168, 228–236.
- Marr, A.G., and Ingraham, J.L. (1962). Effect of Temperature on the Composition of Fatty Acids in Escherichia Coli. *J. Bacteriol.* 84, 1260–1267.
- Martinez, M.C., Lazdunski, C., and Pattus, F. (1983). Isolation, molecular and functional properties of the C-terminal domain of colicin A. *Embo J* 2, 1501–1507.
- Matsuzaki, K., Sugishita, K., Ishibe, N., Ueha, M., Nakata, S., Miyajima, K., and Epand, R.M. (1998). Relationship of Membrane Curvature to the Formation of Pores by Magainin 2†. *Biochemistry* 37, 11856–11863.
- Nardi, A., Slatin, S.L., Baty, D., and Duché, D. (2001). The C-terminal half of the colicin A pore-forming domain is active in vivo and in vitro. *Journal of Molecular Biology* 307, 1293–1303.
- Ng, C.L., Lang, K., Meenan, N.A.G., Sharma, A., Kelley, A.C., Kleanthous, C., and Ramakrishnan, V. (2010). Structural Basis for 16S Ribosomal RNA Cleavage by the Cytotoxic Domain of Colicin E3. *Nature Structural & Molecular Biology* 17, 1241–1246.
- Ogawa, T., Tomita, K., Ueda, T., Watanabe, K., Uozumi, T., and Masaki, H. (1999). A Cytotoxic Ribonuclease Targeting Specific Transfer RNA Anticodons. *Science* 283, 2097–2100.
- Padmavathi, P.V.L., and Steinhoff, H.-J. (2008). Conformation of the Closed Channel State of Colicin A in Proteoliposomes: An Umbrella Model. *Journal of Molecular Biology* 378, 204–214.
- Parker, M.W., and Feil, S.C. (2005). Pore-forming protein toxins: from structure to function. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 88, 91–142.
- Pils, H., Smajs, D., and Braun, V. (1998). The Tip of the Hydrophobic Hairpin of Colicin U Is Dispensable for Colicin U Activity but Is Important for Interaction with the Immunity Protein. *Journal of Bacteriology* 180, 4111–4115.
- Postle, K. (1993). TonB protein and energy transduction between membranes. *J. Bioenerg. Biomembr.* 25, 591–601.

- Pressler, U., Braun, V., Wittmann-Liebold, B., and Benz, R. (1986). Structural and functional properties of colicin B. *Journal of Biological Chemistry* 261, 2654–2659.
- Prieto, L., and Lazaridis, T. (2011). Computational studies of colicin insertion into membranes: The closed state. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 79, 126–141.
- Raymond, L., Slatin, S.L., and Finkelstein, A. (1985). Channels formed by colicin E1 in planar lipid bilayers are large and exhibit pH-dependent ion selectivity. *J. Membr. Biol.* 84, 173–181.
- Riley, M.A., and Gordon, D.M. (1996). The ecology and evolution of bacteriocins. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 17, 151–158.
- Roos, U., Harkness, R.E., and Braum, V. (1989). Assembly of colicin genes from a few DNA fragments. Nucleotide sequence of colicin D. *Molecular Microbiology* 3, 891–902.
- Sharma, O., Yamashita, E., Zhalnina, M.V., Zakharov, S.D., Datsenko, K.A., Wanner, B.L., and Cramer, W.A. (2007). Structure of the Complex of the Colicin E2 R-domain and Its BtuB Receptor. *Journal of Biological Chemistry* 282, 23163–23170.
- Shin, Y.-K., Levinthal, C., Levinthal, F., and Hubbell, W.L. (1993). Colicin E1 Binding to Membranes: Time-Resolved Studies of Spin-Labeled Mutants. *Science (Washington)* 259, 960–963.
- Schein, S.J., Kagan, B.L., and Finkelstein, A. (1978). Colicin K acts by forming voltage-dependent channels in phospholipid bilayer membranes. , Published Online: 09 November 1978; | Doi:10.1038/276159a0 276, 159–163.
- Smajs, D., Pilsl, H., and Braun, V. (1997). Colicin U, a novel colicin produced by *Shigella boydii*. *Journal of Bacteriology* 179, 4919–4928.
- Smarda, J., and Smajs, D. (1998). Colicins--exocellular lethal proteins of *Escherichia coli*. *Folia Microbiol. (Praha)* 43, 563–582.
- Sobko, A., Kotova, E., Zakharov, S., Cramer, W., and Antonenko, Y. (2006a). Lipid-mediated inactivation of colicin E1 channels by calcium ions. *Biochemistry (Moscow)* 71, 99–103.
- Sobko, A.A., Kotova, E.A., Antonenko, Y.N., Zakharov, S.D., and Cramer, W.A. (2006b). Lipid Dependence of the Channel Properties of a Colicin E1-Lipid Toroidal Pore. *J. Biol. Chem.* 281, 14408–14416.
- Sobko, A.A., Vigasina, M.A., Rokitskaya, T.I., Kotova, E.A., Zakharov, S.D., Cramer, W.A., and Antonenko, Y.N. (2004). Chemical and Photochemical Modification of Colicin E1 and Gramicidin A in Bilayer Lipid Membranes. *Journal of Membrane Biology* 199, 51–62.
- Stroud, R.M., Reiling, K., Wiener, M., and Freymann, D. (1998). Ion-channel-forming colicins. *Current Opinion in Structural Biology* 8, 525–533.
- Sulakvelidze, A. (2000). *Yersinia* other than *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, and *Y. pestis*: the ignored species. *Microbes and Infection* 2, 497–513.
- Šmajs, D., Doležalová, M., Macek, P., and Židek, L. (2008). Inactivation of colicin Y by intramembrane helix–helix interaction with its immunity protein. *FEBS Journal* 275, 5325–5331.

- Šmajs, D., and Weinstock, G.M. (2001). Genetic Organization of Plasmid ColJs, Encoding Colicin Js Activity, Immunity, and Release Genes. *Journal of Bacteriology* 183, 3949–3957.
- Tatsumi, Y., Maejima, T., and Mitsuhashi, S. (1995). Mechanism of tonB-Dependent Transport of KP-736, a 1,5-Dihydroxy-4-Pyridone-Substituted Cephalosporin, into Escherichia Coli K-12 Cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 613–619.
- Tory, M.C., and Merrill, A.R. (1999). Adventures in Membrane Protein Topology A STUDY OF THE MEMBRANE-BOUND STATE OF COLICIN E1. *J. Biol. Chem.* 274, 24539–24549.
- Ursing, J., and Aleksic, S. (1995). *Yersinia frederiksenii*, a genotypically heterogeneous species with few differential characteristics. In *Yersiniosis: Present and Future*, G. Ravagnan, and C. Chiesa, eds. (Basel: Karger), pp. 112–116.
- Varenne, S., Cavard, D., and Lazdunski, C. (2005). Biosynthesis and Export of Colicin A in *Citrobacter freundii* CA31. *European Journal of Biochemistry* 116, 615–620.
- Vetter, I.R., Parker, M.W., Tucker, A.D., Lakey, J.H., Pattus, F., and Tsernoglou, D. (1998). Crystal structure of a colicin N fragment suggests a model for toxicity. *Structure* 6, 863–874.
- Viejo, M.B., Gargallo, D., Ferrer, S., Enfedaque, J., and Regué, M. (1992). Cloning and DNA Sequence Analysis of a Bacteriocin Gene of *Serratia Marcescens*. *J Gen Microbiol* 138, 1737–1743.
- Weaver, C.A., Kagan, B.L., Finkelstein, A., and Konisky, J. (1981). Mode of action of colicin Ib Formation of ion-permeable membrane channels. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 645, 137–142.
- Wei, Z., White, D., Wang, J., Musse, A.A., and Merrill, A.R. (2007). Tilted, Extended, and Lying in Wait: The Membrane-Bound Topology of Residues Lys-381–Ser-405 of the Colicin E1 Channel Domain†. *Biochemistry* 46, 6074–6085.
- Wiener, M., Freymann, D., Ghosh, P., and Stroud, R.M. (1997). Crystal structure of colicin Ia. *Nature* 385, 461–464.
- Yajima, S., Nakanishi, K., Takahashi, K., Ogawa, T., Hidaka, M., Kezuka, Y., Nonaka, T., Ohsawa, K., and Masaki, H. (2004). Relation between tRNase activity and the structure of colicin D according to X-ray crystallography. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 322, 966–973.
- Yang, C.C., and Konisky, J. (1984). Colicin V-treated *Escherichia coli* does not generate membrane potential. *J Bacteriol* 158, 757–759.
- Yao, X.L., and Hong, M. (2005). Effects of Anionic Lipid and Ion Concentrations on the Topology and Segmental Mobility of Colicin Ia Channel Domain from Solid-State NMR†. *Biochemistry* 45, 289–295.
- Zakharov, S.D., and Cramer, W.A. (2002). Colicin crystal structures: pathways and mechanisms for colicin insertion into membranes. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1565, 333–346.
- Zakharov, S.D., Eroukova, V.Y., Rokitskaya, T.I., Zhalnina, M.V., Sharma, O., Loll, P.J., Zgurskaya, H.I., Antonenko, Y.N., and Cramer, W.A. (2004a). Colicin Occlusion of OmpF and TolC Channels: Outer Membrane Translocons for Colicin Import. *Biophys J* 87, 3901–3911.

Zakharov, S.D., Heymann, J.B., Zhang, Y.L., and Cramer, W.A. (1996). Membrane binding of the colicin E1 channel: activity requires an electrostatic interaction of intermediate magnitude. *Biophys J* 70, 2774–2783.

Zakharov, S.D., Kotova, E.A., Antonenko, Y.N., and Cramer, W.A. (2004b). On the role of lipid in colicin pore formation. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1666, 239–249.

Zakharov, S.D., Lindeberg, M., Griko, Y., Salamon, Z., Tollin, G., Prendergast, F.G., and Cramer, W.A. (1998). Membrane-bound state of the colicin E1 channel domain as an extended two-dimensional helical array. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 4282–4287.

Zerrouk, Z., Alexandre, S., Lafontaine, C., Norris, V., and Valleton, J.-M. (2008). Inner membrane lipids of *Escherichia coli* form domains. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 63, 306–310.

Zeth, K., Römer, C., Patzer, S.I., and Braun, V. (2008). Crystal Structure of Colicin M, a Novel Phosphatase Specifically Imported by *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 283, 25324–25331.

Soubor z internetu:

Ion Channel Function - Course NEUR 0102: Principles of Neurobiology - Brown University Wiki. Citováno 14.5.2012, dostupné z :

<https://wiki.brown.edu/confluence/display/Spring07BN0102S01/Ion+Channel+Function>

Schema zapojení aparatury, Radovan Fišer, scheme.png (PNG obrázek, 1246 × 1027 bodů) - Měřítko (34%). (cit. 14.5.2012). Dostupné z: URL:<http://pcfiser.natur.cuni.cz/BLM/scheme.png>

QUB - Software for single-molecule biophysics. (cit. 14.5.2012). Dostupné z: URL:<http://www.qub.buffalo.edu/>